

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

VERSION CORRIGÉE

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 janvier 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/004756 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 38/29, 38/17, 39/395, A61P 35/00

(74) Mandataires : BECKER, Philippe etc.; Becker et Asso-
ciés, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002084

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 4 juillet 2003 (04.07.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/08501 5 juillet 2002 (05.07.2002) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :
UNIVERSITE LOUIS PASTEUR [FR/FR]; 4, rue
Blaise-Pascal, F-67000 Strasbourg (FR). INSTITUT
NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE
MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac,
F-75654 Paris Cedex 13 (FR). HOPITAUX UNIVER-
SITAIRES DE STRASBOURG [FR/FR]; 1, place de
L'Hôpital, B.P. 426, F-67091 Strasbourg Cedex (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(48) Date de publication de la présente version corrigée:
10 juin 2004

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : MASS-
FELDER, Thierry [FR/FR]; 27, rue de Bindernheim,
F-67230 Witternheim (FR). LANG, Hervé [FR/FR];
17, rue Jacques Peirates, F-67000 Strasbourg (FR).
SCHORDAN, Eric [FR/FR]; 3, rue Principale, F-67117
Handschuheim (FR). HELWIG, Jean-Jacques [FR/FR];
12, rue de Colmar, F-67300 Schiltigheim (FR).

(15) Renseignements relatifs à la correction:
voir la Gazette du PCT n° 24/2004 du 10 juin 2004, Sec-
tion II

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF PTHRP ANTAGONISTS FOR TREATING RENAL CELL CARCINOMA

(54) Titre : UTILISATION D'ANTAGONISTES DE LA PTHrP POUR TRAITER LE CARCINOME A CELLULES RENALES

(57) Abstract: The invention concerns the use of a PTHrP antagonist for preparing a pharmaceutical composition for treating renal cell carcinoma (RCC) in a mammal and in particular in a human subject. Advantageously, the invention is of particular interest for inhibiting or reducing tumor growth and/or metastasis formation in kidney cancer and its metastatic developments, in particular in the lung and the liver.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une utilisation d'un antagoniste de la PTHrP dans la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à traiter le carcinome à cellules rénales (CCR) chez le mammifère et en particulier chez l'homme. De manière avantageuse, la présente invention présente un intérêt tout particulier pour inhiber ou diminuer la croissance tumorale et/ou la formation de métastases dans le cancer du rein et ses évolutions métastatiques, notamment au niveau du poumon et du foie.

WO 2004/004756 A1

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 janvier 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/004756 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

A61K 38/29, 38/17, 39/395, A61P 35/00

Handschuheim (FR). HELWIG, Jean-Jacques [FR/FR];
12, rue de Colmar, F-67300 Schiltigheim (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/002084

(74) Mandataires : BECKER, Philippe etc.; Becker et Asso-
ciés, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international : 4 juillet 2003 (04.07.2003)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

02/08501

5 juillet 2002 (05.07.2002) FR

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : UNI-
VERSITE LOUIS PASTEUR [FR/FR]; 4, rue Blaise-Pas-
cal, F-67000 Strasbourg (FR). INSTITUT NATIONAL
DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE
(INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris
Cedex 13 (FR).

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (pour US seulement) : HOPITAUX UNIVER-
SITAIRES DE STRASBOURG [FR/FR]; 1, place de
L'Hôpital, B.P. 426, F-67091 Strasbourg Cedex (FR).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MASS-
FELDER, Thierry [FR/FR]; 27, rue de Bindernheim,
F-67230 Witternheim (FR). LANG, Hervé [FR/FR];
17, rue Jacques Peirotes, F-67000 Strasbourg (FR).
SCHORDAN, Eric [FR/FR]; 3, rue Principale, F-67117

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF PTHRP ANTAGONISTS FOR TREATING RENAL CELL CARCINOMA

(54) Titre : UTILISATION D'ANTAGONISTES DE LA PTHrP POUR TRAITER LE CARCINOME A CELLULES RENALES

(57) Abstract: The invention concerns the use of a PTHrP antagonist for preparing a pharmaceutical composition for treating renal cell carcinoma (RCC) in a mammal and in particular in a human subject. Advantageously, the invention is of particular interest for inhibiting or reducing tumor growth and/or metastasis formation in kidney cancer and its metastatic developments, in particular in the lung and the liver.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une utilisation d'un antagoniste de la PTHrP dans la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à traiter le carcinome à cellules rénales (CCR) chez le mammifère et en particulier chez l'homme. De manière avantageuse, la présente invention présente un intérêt tout particulier pour inhiber ou diminuer la croissance tumorale et/ou la formation de métastases dans le cancer du rein et ses évolutions métastatiques, notamment au niveau du poumon et du foie.

UTILISATION D'ANTAGONISTES DE LA PTHrP POUR TRAITER LE CARCINOME A CELLULES RENALES

La présente invention a pour objet l'utilisation d'au moins un antagoniste de
5 la PTHrP dans la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à traiter
le carcinome à cellules rénales (CCR) chez le mammifère et en particulier chez
l'homme. De manière avantageuse, la présente invention présente un intérêt tout
particulier pour inhiber ou diminuer la croissance tumorale et/ou la formation de
métastases dans le cancer du rein et ses évolutions métastatiques, notamment au
10 niveau du poumon et du foie.

La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne (*parathyroid
hormone-related protein*, ou PTHrP) est une poly-hormone. Elle a été découverte
en 1987 à partir de tumeurs hypercalcémiantes chez l'homme et est reconnue
aujourd'hui comme étant la principale responsable du syndrome d'hypercalcémie
15 humorale maligne, un syndrome paranéoplasique associé à un grand nombre de
tumeurs (Philbrick W. M. et al., *Physiol. Rev*, 76:127-73, 1996).

A côté des tumeurs, la PTHrP est exprimée de manière ubiquitaire par les
tissus normaux, où elle apparaît notamment comme un nouveau facteur régulant
localement la croissance, la différenciation, et la mort cellulaire. Son importance
20 biologique est clairement mise en évidence par la mort précoce *in utero* des souris
chez lesquelles le gène de la PTHrP ou celui de son récepteur (le récepteur
commun PTH/PTHrP, ou RPTH1) ont été invalidés. Le rein n'échappe pas à cette
règle : la PTHrP est exprimée dans toutes les composantes fonctionnels du rein
(vaisseaux, glomérules, tubules) et y exerce des effets sur la prolifération et la
25 différenciation cellulaire dans les conditions normales et pathologiques. Les
inventeurs de la présente invention ont considérablement participé à la mise en
évidence de ces propriétés.

Il a été identifié trois isoformes de la PTHrP. Chez l'homme, le gène de la
PTHrP (chromosome 12) code pour 3 isoformes de 139, 141 et/ou 173 acides
30 aminés (seulement les formes de 139 et/ou de 141 acides aminés sont présentes
chez les espèces inférieures : souris, rats, lapins, ...). Ces isoformes contiennent
dans leur structure primaire un certain nombre de sites multi-basiques (multi-K/R)
qui servent de sites post-traductionnelles de protéolyse permettant de générer
plusieurs fragments tous biologiquement actifs: un fragment amino-terminal (1-36)

qui contient une homologie de séquence limitée avec l'hormone parathyroïdienne (8 acides aminés sur les 13 premiers sont identiques entre hormone parathyroïdienne, nommée PTH, et PTHrP); une forme intermédiaire (38-94/95/101) et des formes carboxy-terminale (107-139) et probablement chez
5 l'homme seulement une forme (141-173) (Philbrick et al., *Physiol. Rev.* 76: 127-173, 1996; Wu et al., *J. Biol. Chem.*, 271: 24371-24381, 1996). En outre, des combinaisons des diverses formes énumérées ci-dessus peuvent également être des fragments de sécrétion. Ainsi, par exemple, au cours de l'hypercalcémie
10 humorale maligne, un des fragments sécrétés par les tumeurs est un fragment amino-terminal contenant également la région intermédiaire dont on ne connaît toujours pas l'extrémité carboxy-terminale (fragment représenté par (1-?) sur la figure 1).

Les rôles biologiques de la PTHrP peuvent être résumés de la manière suivante :

- 15 - la myorelaxation des muscles lisses vasculaires et extra-vasculaires (fragments amino-terminaux),
- la régulation du transport trans-épithélial du calcium dans le rein, le placenta et la glande mammaire (fragments intermédiaires),
- rôle majeur au cours du développement qui a été mis en évidence par la létalité
20 précoce *in utero* des souris invalidées pour le gène de la PTHrP ou de son récepteur (Philbrick et al., *Physiol. Rev.* 76 : 127-173, 1996),
- régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire et également de la mort cellulaire (tous les fragments).

Il est intéressant de mentionner que les séquences multi-basiques
25 présentes dans la région intermédiaire de la molécule servent en réalité non seulement de sites post-traductionnels de protéolyse mais également de sites de localisation nucléaire (SLN) permettant à la molécule d'être dirigée vers le noyau cellulaire et de là de réguler la prolifération, la différenciation cellulaire, et la mort cellulaire par des mécanismes encore inconnus.

30 A l'heure actuelle, seul le récepteur liant les fragments amino-terminaux a été cloné, le récepteur commun PTH/PTHrP, dénommé RPTH1. Des données pharmacologiques existent quant à l'existence de récepteurs spécifiques des formes intermédiaires et carboxy-terminales.

En outre, il a récemment été montré que la PTHrP non seulement présente des activités angiogéniques sur les cellules endothéliales en culture, mais également qu'elle est capable de stimuler l'expression du facteur endothélial dérivé de l'endothélium (VEGF pour « vascular endothelial-derived growth factor ») dans diverses lignées cellulaires (Akino et al., *Endocrinology*, 141: 4313-4316, 2000 ; Esbrit et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11:1085-1092, 2000).

Le carcinome à cellules rénales CCR est le groupe de tumeurs le plus fréquent du rein puisqu'il représente environ 80 à 85 % de l'ensemble des tumeurs du rein chez l'adulte. Le CCR peut se décomposer en 5 sous-types d'un point de vue pathologique, celui à cellules claires (CCC, incluant la variante à cellules acidophiles) étant la forme majoritaire puisqu'il représente environ 85% des CCR. Les autres sous-types par ordre décroissant d'incidence sont le carcinome papillaire (chromophiles), le carcinome à cellules chromophobes, le carcinome de Bellini et les carcinomes à cellules rénales non classées. Le carcinome rénal à cellules claires (CCC) qui représente presque 75 % des tumeurs malignes du rein et 2 % des décès liés au cancer en France et à travers le monde (7 000 cas/an et 3 500 décès en France en 2000 ; 200 000 cas/an et 100 000 décès/an à travers le monde) est une tumeur hyper-vascularisée qui trouve son origine au niveau de l'épithélium tubulaire proximal du rein. Les propriétés de la PTHrP décrites ci-dessus, avec d'une part la description d'un effet régulateur de la PTHrP sur la prolifération des cellules tubulaires proximales rénales (Garcia-Ocana et al, *J. Bone Miner. Res.*, 10 :1875-1884, 1995 et Garcia-Ocana et al, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10 : 238-244, 1999) et d'autre part les observations que la PTHrP immunoréactive est retrouvée dans les tumeurs chez 95 % des patients atteints de CCC (Iwamura et al, *Cancer*, 86 : 1028-1034, 1999), quelque soit leur calcémie, ont poussé les auteurs de la présente invention à rechercher le rôle du système PTHrP/RPTH1 dans le développement, la croissance et la néo-vascularisation de ces tumeurs. Ceci dans l'espoir de pouvoir mettre au point une thérapeutique efficace contre le CCR et en particulier contre le CCC, notamment contre sa forme métastatique, basée sur l'utilisation des composants du système PTHrP/RPTH1.

En effet, hormis la néphrectomie totale ou partielle applicable aux tumeurs localisées, aucune thérapie n'est actuellement efficace contre les formes métastatiques de ces tumeurs, celles-ci étant très résistantes aux traitements traditionnels qu'il s'agisse de l'hormonothérapie, de la chimiothérapie, de la

radiothérapie et, à un degré moindre (taux de réponse inférieur à 15%), de l'immunothérapie (à base d'interleukines et d'interférons). Ainsi, actuellement aucune thérapie n'est réellement efficace contre le cancer du rein, alors que son incidence est en constante progression (45 % entre 1980 et 2000), et que le taux
5 de survie est de 5 % à 5 ans en cas d'atteinte métastatique.

Un des aspects importants est que l'un des facteurs favorisant le carcinome à cellules rénales est la maladie de Von Hippel-Lindau (VHL) (Motzer et al., *New Engl. J. Med.*, 335 : 865-875, 1996). En effet, cette maladie est caractérisée par un fort taux, entre autres, de carcinomes à cellules rénales chez
10 les patients. Ces carcinomes surviennent tôt, vers 30-40 ans. L'analyse génétique des patients a permis de découvrir un gène suppresseur de tumeur, le gène VHL (chromosome 3p), qui est inactif chez ces patients. Par la suite, les recherches ont permis de montrer que ce gène était également inactif chez la majorité des patients atteints d'un carcinome à cellules rénales non familial (dit sporadique),
15 c'est-à-dire dans la population générale (Motzer et al., *New Engl. J. Med.*, 335 : 865-875, 1996; Vogelzang et al., *Lancet*, 352 : 1691-1696, 1998).

Ainsi, les auteurs de la présente invention ont trouvé qu'in vitro sur diverses lignées cellulaires bien caractérisées issues de CCC humains, la PTHrP et le RPTH1 sont exprimés et que le blocage du système PTHrP/RPTH1 à l'aide
20 d'anticorps dirigés contre la PTHrP ou d'un antagoniste compétitif des RPTH1 inhibe puissamment la prolifération cellulaire, mesurée en nombre de cellules et en incorporation de bromodéoxyuridine, ou BrdU. En effet, ces taux d'inhibition varient de 20 à 70 % suivant la lignée cellulaire et l'inhibiteur utilisé, un effet qui apparaît être la conséquence d'un double effet anti-prolifératif et de stimulation de
25 la mort cellulaire tumorale.

De plus, in vivo, l'efficacité d'un traitement bloquant le système PTHrP/RPTH1 à l'aide d'un antagoniste compétitif des RPTH1 ou d'un anticorps anti-PTHrP a été testé chez la souris « nude » immunodéficiente. Il s'agit d'un modèle animal qui tolère l'implantation de tumeurs humaines permettant de tester
30 l'efficacité de substances contre la croissance tumorale et la formation de métastases. Cette implantation peut se faire en sous-cutanée (implantation non invasive) ou de manière dite « orthotopique » (implantation invasive avec formation de métastases), c'est-à-dire en ce qui concerne le rein directement sous la capsule rénal. Après implantation en sous-cutanée des tumeurs humaines, les

5 résultats montrent que le traitement sur une période de 25 jours par l'antagoniste des RPTH1 ou l'anticorps anti-PTHrP bloque la croissance des tumeurs implantées. Un traitement quotidien par l'anticorps anti-PTHrP a permis d'obtenir une regression complète de 70 % des tumeurs implantées et une regression
5 partielle de 50 à 80 % des tumeurs restantes sur une période de 17 jours chez la souris nude.

Il est important de noter que les expériences montrent également que l'expression de la PTHrP est une cible directe ou indirecte du produit du gène suppresseur de tumeurs VHL (pour Von Hippel-Lindau), un gène défectueux dans
10 les formes familiales de CCC (maladie de Von Hippel-Lindau) et dans la majorité (75 %) des CCC dits sporadiques (par opposition à familiaux). Dans ce schéma de régulation, l'absence de VHL actif dans les cellules tumorales est à l'origine d'une sur-expression de PTHrP. L'activité biologique fondamentale du VHL est la
15 dégradation, en condition normoxique et via le protéasome, du facteur HIF-1 α (pour « Hypoxic-induced factor ») qui régule au niveau transcriptionnel l'expression des gènes impliqués dans la réponse cellulaire à l'hypoxie comme le VEGF, l'érythropoïétine et des facteurs de croissance et de différenciation cellulaire. Les conséquences d'une expression défectueuse du VHL sont donc une
20 dédifférenciation cellulaire, une prolifération cellulaire accrue et la synthèse de facteurs angiogéniques à l'origine notamment de l'hypermécanisation des CCC. On comprend donc aisément l'importance du lien existant entre l'expression du VHL et celle de la PTHrP.

La présente invention décrit plus particulièrement un système utilisant des antagonistes des RPTH1 pour bloquer la croissance des cellules tumorales de
25 carcinome rénal à cellules claires humaines *in vitro* et *in vivo*.

Le cancer du rein se place en troisième position parmi les cancers de l'appareil urogénital après ceux de la prostate et de la vessie. Le CCC est plus fréquent chez l'homme que chez la femme avec un pic d'incidence entre 50 et 70 ans. Comme explicité ci-dessus, son incidence est en constante progression, et
30 explique environ 2 % des décès liés au cancer en France et dans le monde. Le taux de mortalité est d'environ 30 %, mais le stade tumoral reste actuellement le meilleur facteur pronostic. Le taux de survie à 5 ans est de 70 % en cas de tumeurs purement intrarénales. Ce taux chute à 5 % en cas d'évolutions métastatiques (poumon, foie essentiellement), ce qui survient dans près de 30 %

des cas en raison du caractère latent et relativement asymptomatique du CCC. Une des caractéristiques fondamentales de ces tumeurs est leur résistance à toutes les thérapies actuellement disponibles incluant l'hormonothérapie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'immunothérapie. Ainsi, dans le cas des
5 cancers du rein métastatiques, la chimiothérapie et les traitements destinés à stimuler les défenses immunitaires (comme les interleukines et les interférons) donnent des résultats décevants avec des réponses ne dépassant pas 15 % et avec des effets secondaires très délétères sur les patients.

La présente invention propose donc une nouvelle thérapeutique basée sur
10 l'utilisation d'antagonistes de PTHrP pour traiter les patients atteints de CCC, éventuellement avant et/ou après néphrectomie (préconisée dans les CCC, quelque soit le stade tumoral), notamment dans le but d'inhiber la croissance de la tumeur primitive et la croissance et/ou le développement des métastases associées, voire de faire régresser les tumeurs et les métastases.

15 Les études faites sur des antagonistes de la PTHrP sur l'animal - souris, rat et chien - dans un certain nombre de publications ne semblent pas montrer d'effets délétères sur les fonctions vitales, ce qui présente l'avantage de prévoir une certaine innocuité de ces composés.

Ainsi, la présente invention a pour objet l'utilisation d'au moins un
20 antagoniste de la PTHrP dans la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à traiter, de manière préventive ou curative, un cancer du rein et en particulier le carcinome à cellules rénales (CCR) chez le mammifère et en particulier chez l'homme.

Elle concerne en particulier l'utilisation d'au moins un antagoniste de la
25 PTHrP pour traiter le carcinome papillaire (chromophiles), le carcinome à cellules chromophobes, le carcinome de Bellini ou les carcinomes à cellules rénales non classées de CCR, de préférence ces composés permettent de traiter le carcinome à cellules claires (CCC).

De manière avantageuse, la présente invention présente un intérêt tout
30 particulier pour inhiber ou diminuer la croissance tumorale et/ou la formation de métastases dans le cancer du rein et/ou ses évolutions métastatiques, notamment au niveau du poumon et du foie. Cette inhibition ou cette diminution peut aller, pour un fort pourcentage, jusqu'à la régression complète des tumeurs et des métastases associées au cancer du rein.

Il s'agit avantageusement d'une composition pharmaceutique pour le traitement (curatif) ou la prophylaxie (préventif) des cancers du rein.

Les tumeurs malignes solides se répartissent en carcinomes (95%) et sarcomes (5%). Le développement des carcinomes et des sarcomes est corrélé à la mise en place d'une vascularisation des tumeurs, dénommée angiogénèse. Toute inhibition de cette angiogénèse tumorale permet de faire régresser, ou pour le moins de suspendre ou de retarder le développement des tumeurs. Or, il a été trouvé de manière surprenante que des anticorps anti-PTHrP et/ou des antagonistes des RPTH1 ont non seulement un effet sur les tumeurs, mais également un effet sur l'angiogénèse.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont utilisables notamment pour le traitement de tumeurs malignes du cancer du rein, plus précisément le traitement de tumeurs malignes solides.

Elles sont également utilisables pour inhiber partiellement ou totalement l'angiogénèse tumorale.

L'invention concerne également une méthode de traitement du cancer du rein, en particulier des carcinomes à cellules claires, comprenant l'administration à un sujet, notamment humain, d'une dose efficace d'un antagoniste de la PTHrP ou d'une composition pharmaceutique le contenant.

Dans la présente invention, le terme "un antagoniste de la PTHrP" inclut toute substance diminuant le ou les effets biologiques de la PTHrP, notamment ceux décrits ci-dessus. Une substance correspond à un composé ou à un mélange de composés.

Cette substance peut être en particulier une substance se liant au récepteur de la PTHrP inhibant de manière partielle, voire totale, la liaison de la PTHrP à son récepteur. De préférence, cette substance est un antagoniste du récepteur de la PTHrP, et de préférence un antagoniste compétitif de la PTHrP. Ces antagonistes incluent des peptides de la PTH ou de la PTHrP comprenant une substitution ou une délétion d'au moins un acide aminé de la séquence de la PTH et de la PTHrP ou une séquence partielle des peptides PTH ou PTHrP, éventuellement comprenant une substitution ou une délétion d'au moins un acide aminé de leur séquence. Des exemples spécifiques de substances antagonistes se liant aux récepteurs de PTHrP incluent la PTHrP (3-34), PTHrP (7-34), PTHrP (8-34), PTHrP (9-34), PTHrP (10-34), leurs amides ou leurs variants. Les variants

présentent un remplacement, une délétion ou une addition d'au moins un acide aminé, tels que notamment (Asn10, Leu11, D-Trp12) PTHrP (7-34) amide (humain ou murin). En outre, parmi les polypeptides décrits ci-dessus, sont également compris ceux qui présentent une délétion, une substitution, une addition ou une insertion d'au moins un acide aminé de la séquence peptidique de la PTH ou de la PTHrP et qui présentent une activité antagoniste à la PTHrP. On peut également citer, comme antagoniste de la PTHrP, un dérivé du TIP (pour « tuberoinfundibular peptide »), tel que des peptides tronqués du TIP(1-39) (pour « tuberoinfundibular peptide » 1-39), notamment le TIP(7-39) et ses dérivés qui ont été décrits comme des antagonistes puissants des RPTH1 (Hoare et al, Peptides 23 : 989-998, 2002).

Selon un autre mode de la présente invention, l'antagoniste de la PTHrP peut être une substance non peptidique diminuant le ou les effets biologiques de la PTHrP.

15 L'antagoniste de la PTHrP peut être également une substance se liant à un ligand du récepteur de la PTHrP inhibant ainsi de manière partielle, voire totale, la liaison de PTHrP à son récepteur. Cette substance peut être choisie parmi les anticorps anti-PTHrP, et parmi ceux-ci de préférence un anticorps anti-PTHrP humanisé.

20 Selon un aspect particulier de l'invention, l'antagoniste de la PTHrP peut correspondre à une substance permettant d'augmenter la présence de VHL actif, diminuant ainsi le ou les effets biologiques de la PTHrP. Dans ce cadre, cette substance peut correspondre au produit du gène suppresseur de tumeurs VHL pouvant être obtenu en particulier par thérapie génique.

25 Par ailleurs, l'antagoniste de la PTHrP peut également correspondre à une substance permettant de réduire l'expression de la PTHrP. Cette substance se lie à l'ARNm ou au gène de PTHrP en inhibant, de manière partielle, voire totale, l'expression de PTHrP. Cette substance peut être par exemple un oligonucléotide antisense de la PTHrp, un ARNi, un facteur de transcription réprimant l'expression du gène de la PTHrP, ou une substance diminuant la stabilité de l'ARNm de la PTHrP.

La présente invention inclut également la possibilité de mettre en œuvre plusieurs sortes d'antagonistes de la PTHrP telles que définies ci-dessus pour traiter le cancer du rein. Ainsi, la présente invention inclut, par exemple, une

méthode de traitement incluant une thérapie génique telle que décrite ci-dessus et l'administration d'un antagoniste de la PTHrP, tel qu'un antagoniste du récepteur de la PTHrP ou un anticorps anti-PTHrP.

5 Dans la présente invention, le terme "un récepteur de la PTHrP " inclut un récepteur se liant au PTHrP, et inclut en particulier le récepteur PTH/PTHrP de type I (dénommé RPTH1).

Le terme "ligand" inclut une substance se liant à un enzyme ou un récepteur.

10 Le terme "une substance se liant à un ligand d'un récepteur de PTHrP inhibant la liaison entre le ligand et le récepteur" inclut une substance (e.g., un anticorps anti-PTHrP) qui inhibe la liaison d'un ligand (e.g., PTHrP) à un récepteur du PTHrP par liaison audit ligand du récepteur de PTHrP. Des exemples d'anticorps anti-PTHrP incluent des anticorps tels qu'un anticorps humanisé, un
15 anticorps humain, un anticorps chimérique, un anticorps (tel que l'anticorps #23-57-137-1) obtenu à partir d'un hybridome (tel que l'hybridome #23-57-137-1) ou un fragment de ces anticorps et/ou une forme modifiée dudit fragment. L'anticorps peut être polyclonal, mais de préférence est monoclonal.

Le terme "un anticorps humanisé" inclut un anticorps comprenant une partie
20 dérivée d'un anticorps humain et des régions déterminantes complémentaires (CDRs) dérivées d'un anticorps autre qu'humain (e.g. anticorps murin).

L'anticorps utilisé dans la présente invention peut être produit par des méthodes connues de l'homme de l'art. De préférence, l'anticorps anti-PTHrP est un anticorps monoclonal dérivé d'un mammifère.

25 Cet anticorps inclut notamment ceux produits à partir d'un hybridome et ceux produits par des techniques génétiques à partir de cellules hôtes transformées avec un vecteur d'expression recombinant portant un gène codant pour l'anticorps. L'anticorps peut se lier à la PTHrP et empêcher la liaison de la PTHrP à son récepteur, bloquant ainsi le signal de transduction de PTHrP et par
30 conséquent inhibant l'activité biologique de PTHrP.

A titre d'exemples, on peut notamment citer les anticorps anti-PTHrP(1-34) (humain, rat) de la société Bachem (Bachem Biochimie Sarl, Voisins-le-Bretonneux, France), l'anticorps anti-PTHrP(34-53) (Ab-2, humain) de la société Oncogene (France Biochem, Meudon, France), l'anticorps #23-57-137-1

(notamment décrit dans la demande de brevet EP1197225) et l'anticorps anti-PTHrP(107-139) (humain) obtenu par des méthodes conventionnelles de préparation d'anticorps.

L'hybridome produisant des anticorps monoclonaux peut être obtenu de la
5 manière suivante. La PTHrP est utilisée en tant qu'antigène pour immunisation selon des méthodes conventionnelles d'immunisation. Les immunocytes qui en résultent sont fusionnés avec des cellules parentes connues selon des méthodes de fusions cellulaires conventionnelles, et les cellules produisant les anticorps sont alors criblées à partir des cellules fusionnées par des méthodes de criblage
10 conventionnelles.

La PTHrP humaine utilisée en tant qu'agent antigène pour produire des anticorps est préparée par expression de la séquence du gène PTHrP décrit par Suva, L. J. et al., Science, 237, 893, 1987. Une séquence nucléotidique codant la PTHrP est insérée dans un vecteur d'expression connu, et une cellule hôte
15 adaptée est transformée avec ce vecteur d'expression. La protéine PTHrP est ensuite isolée et purifiée à partir des cellules hôtes transformées ou à partir du surnageant obtenu à partir des cellules hôtes transformées, par des méthodes conventionnelles. La protéine PTHrP ainsi obtenue est utilisée comme antigène.

Selon un autre mode, un peptide correspondant à une séquence partielle
20 du peptide PTHrP peut être chimiquement synthétisé et utilisé comme antigène. En particulier, une séquence partielle de 34-amino-acides de la région N-terminale de la séquence peptidique de PTHrP peut être chimiquement synthétisée et utilisée comme antigène.

Le mammifère à immuniser avec cet antigène peut être de tout type. Le
25 mammifère est de préférence choisi en tenant compte de la compatibilité avec la cellule parente utilisée pour la fusion. On utilise généralement un rongeur (e.g., souris, rat ou hamster), un lapin ou un singe.

L'immunisation du mammifère avec l'antigène peut être réalisée par toute méthode connue en soi, par exemple, par injection intra péritonéale ou sous-
30 cutanée de l'antigène au mammifère. Plus spécifiquement, l'antigène est dilué de manière appropriée dans une solution tampon-phosphate (PBS) ou une solution saline physiologique, la dilution en résultant ou la suspension est ensuite mélangée en quantité appropriée avec un adjuvant conventionnel (e.g., Freund's complete adjuvant) pour obtenir une émulsion. L'émulsion est injectée au mammifère

plusieurs fois à des intervalles de 4 à 21 jours. L'antigène peut éventuellement être attaché à un support approprié.

Après l'immunisation, le niveau antigénique du sérum est vérifié. Lorsque le niveau désiré est obtenu, les immunocytes sont isolés à partir du mammifère et fusionnés. L'immunocyte préféré utilisé est une cellule splénique.

La cellule parente utilisée pour la fusion est une cellule de myélome dérivé d'un mammifère. Cette cellule peut être toute lignée cellulaire connue et est par exemple P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. 123, 1548-1550, 1979), P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology 81, 1-7, 1978), NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol., 6, 511-519, 1976), MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell, 8, 405-415, 1976), SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature, 276, 269-270, 1978), FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods, 35, 1-21, 1980), S194 (Trowbridge, I. S., J. Exp. Med., 148, 313-323, 1978) or R210 (Galfre, G. et al., Nature, 277, 131-133, 1979).

La fusion est réalisée par toute méthode connue, telle que la méthode de Milstein et al. (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol., 73, 3-46, 1981). En particulier, la fusion est réalisée dans un milieu de culture classique en présence d'un promoteur de fusion cellulaire. Le promoteur de fusion peut être le polyéthylène glycol (PEG) ou un virus connu à cet effet, tel que le virus de Sendai (hemagglutinating virus of Japan; HVJ). Si nécessaire, pour améliorer l'efficacité de la fusion, un additif peut être incorporé, tel que le diméthyl sulfoxyde.

Le rapport des cellules immunocytes et du myélome peut varier dans une large mesure. A titre illustratif, les immunocytes peuvent être présents en quantité 1 à 10 fois plus importante que les cellules de myélome. Le milieu de culture utilisé pour la fusion est par exemple le milieu RPMI 1640 ou MEM approprié à la croissance des lignées cellulaires de myélome, ou tout autre milieu conventionnellement utilisé pour la culture de lignées cellulaires. Un sérum supplémentaire peut être ajouté au milieu, tel que le sérum de veau foetal (SVF, ou FCS pour « foetal calf serum »).

La fusion est donc réalisée en mélangeant les deux types cellulaires dans un milieu de culture, en ajoutant de préférence une solution de PEG au milieu généralement à une concentration de 30-60% (w/v). La solution est ensuite mélangée produisant ainsi les cellules fusionnées désirées, les hybridomes. Un milieu de culture approprié est ajouté ensuite à la solution obtenue puis l'ensemble

est centrifugé pour retirer le surnageant. Les hybridomes obtenus sont sélectionnés par culture dans un milieu sélectif conventionnel, tel que le milieu hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT), pour supprimer les cellules non désirées (non fusionnées). Une méthode de dilution est ensuite mise en œuvre
5 afin de cribler et de mono-cloner les hybridomes qui sécrètent l'anticorps désiré.

Selon une variante de production d'anticorps n'utilisant pas la technique des hybridomes, une immunisation d'un mammifère humain avec l'antigène tel que décrit ci-dessus peut être réalisée. En particulier, un lymphocyte humain peut être immunisé avec la PTHrP *in vitro*, puis fusionné avec une cellule de myélome
10 humaine immortalisée, produisant ainsi un anticorps humain présentant une activité de liaison contre la PTHrP. Selon un autre mode, un anticorps humain contre PTHrP peut être préparé par injection de PTHrP en tant qu'antigène à un animal transgénique présentant le répertoire entier des gènes des anticorps humains, afin de produire des cellules produisant des anticorps anti-PTHrP, puis
15 par immortalisation des cellules ainsi obtenues. Les cellules immortalisées ainsi préparées produisent l'anticorps humain attendu. Cette méthode est décrite en détail dans les brevets suivants (WO 96/33735 ; EP 822 830 ; US 6,150,584).

Des anticorps recombinants peuvent également être utilisés. Les anticorps recombinants peuvent être préparés par clonage d'un gène codant pour l'anticorps
20 à partir de l'hybridome, en intégrant le gène dans un vecteur approprié, et en introduisant le vecteur dans une cellule hôte, pour produire l'anticorps à partir de cette cellule hôte, selon des techniques de recombinaison génétique conventionnelles (Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem., 192, 767-775, 1990).

Dans la présente invention, un anticorps recombinant modifié
25 artificiellement peut être également utilisé, notamment pour diminuer l'hétérogénéité contre le corps humain. Des anticorps chimériques ou humanisés peuvent ainsi être utilisés. Ces anticorps modifiés peuvent être produits par des méthodes connues.

L'anticorps utilisé dans la présente invention peut être un fragment d'un
30 anticorps ou une forme modifiée de ce fragment, ces substances doivent se lier à la PTHrP et inhiber l'activité biologique de la PTHrP. Ainsi, sont inclus les fragments d'anticorps, tels que Fab, Fab'2, CDRs, etc ou simple chaîne (ScFv).

Les fragments d'anticorps peuvent être produits en préparant des gènes pour ces fragments et en les exprimant dans des cellules hôtes appropriées.

Une forme modifiée d'un anticorps tel que décrit ci-dessus peut être également utilisée, par exemple, un anticorps anti-PTHrP conjugué à une molécule, telle que le polyéthylène glycol. Les anticorps modifiés peuvent être préparés par modification chimique des anticorps tels que décrits ci-dessus. Ces 5 modifications chimiques sont connues de l'homme de l'art.

Pour la production des anticorps utilisés dans la présente invention, tout système d'expression peut être utilisé, tel qu'un système cellulaire eucaryote ou procaryote. Les cellules eucaryotes incluent les lignées cellulaires établies (e.g., mammifères, insectes, champignons et levures). Les cellules procaryotes incluent 10 les bactéries, tels que la bactérie E. Coli.

De préférence, l'anticorps utilisé dans la présente invention est exprimé dans une cellule de mammifère, telle que les cellules CHO, COS, myélome, BHK, Vero ou HeLa.

La cellule hôte transformée est cultivée *in vitro* ou *in vivo* pour produire 15 l'anticorps d'intérêt. Les cellules hôtes sont cultivées dans un milieu approprié conventionnel. Le milieu de culture peut choisi parmi le milieu DMEM, MEM, RPMI 1640 ou IMDM. Le milieu de culture peut comprendre en outre un sérum supplémentaire, tel que le sérum de veau foetal (FCS).

L'anticorps exprimé et produit tel que décrit ci-dessus peut être isolé à partir 20 des cellules ou des animaux hôtes et purifié, par toute méthode connue en soi, notamment en utilisant une colonne d'affinité. Toute autre méthode connue pour isoler et purifier des anticorps peut être employée seule ou en combinaison, notamment à l'aide de chromatographes utilisant des colonnes, par des méthodes de filtration, d'ultrafiltration ou de dialyse.

25 La détermination de l'activité antigénique ou inhibitrice des anticorps ainsi préparés peut être réalisée en mettant en œuvre toute méthode connu de l'homme de l'art, telle que notamment les méthodes ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), EIA (enzyme immunoassay), RIA (radioimmunoassay) ou les méthodes utilisant un anticorps fluorescent.

30 Les compositions pharmaceutiques selon l'invention comprennent avantageusement un ou plusieurs excipients ou véhicules, acceptables sur le plan pharmaceutique. On peut citer par exemple des solutions salines, physiologiques, isotoniques, tamponnées, etc., compatibles avec un usage pharmaceutique et connues de l'homme du métier. Les compositions peuvent contenir un ou

plusieurs agents ou véhicules choisis parmi les dispersants, solubilisants, stabilisants, conservateurs, etc. Des agents ou véhicules utilisables dans des formulations (liquides et/ou injectables et/ou solides) sont notamment la méthylcellulose, l'hydroxyméthylcellulose, la carboxyméthylcellulose, le polysorbate 80, le mannitol, la gélatine, le lactose, des huiles végétales, l'acacia, etc. Les compositions peuvent être formulées sous forme de suspension injectable, de gels, huiles, comprimés, suppositoires, poudres, gélules, capsules, etc., éventuellement au moyen de formes galéniques ou de dispositifs assurant une libération prolongée et/ou retardée. Pour ce type de formulation, on utilise
10 avantageusement un agent tel que la cellulose, des carbonates ou des amidons.

Les composés ou compositions selon l'invention peuvent être administrés de différentes manières et sous différentes formes. Ainsi, ils peuvent être injectés par voie systémique ou orale, de préférence systémique, comme par exemple par
15 voie intraveineuse, intra-musculaire, sous-cutanée, trans-dermique, intra-artérielle, etc. Pour les injections, les composés sont généralement conditionnés sous forme de suspensions liquides, qui peuvent être injectées au moyen de seringues ou de perfusions, par exemple. Il est entendu que le débit et/ou la dose injectée peuvent être adaptés par l'homme du métier en fonction du patient, de la pathologie, du
20 mode d'administration, etc. Typiquement, les composés sont administrés à des doses pouvant varier entre 0,1 µg et 500 mg/kg de poids corporel, plus généralement de 0,01 à 10 mg/kg, typiquement entre 0,1 et 10 mg/kg. En outre, des injections répétées peuvent être réalisées, le cas échéant. D'autre part, les compositions selon l'invention peuvent comprendre, en outre, d'autres agents ou
25 principes actifs.

Légende des Figures

Figure 1 : schéma représentant le gène de la PTHrP et ses isoformes

30

Figure 2 : gels montrant l'expression de la PTHrP et du RPTH1 au niveau de l'ARNm dans 3 échantillons (numérotés 1, 2 et 3) des 3 lignées tumorales 786-0, UOK-126 et UOK-128. Expériences réalisées en RT-PCR.

Figure 3 : Fig. 3A : Dosage de la protéine PTHrP par une méthode radioimmunologique dans le milieu conditionné des 3 lignées tumorales 786-0, UOK-126 et UOK-128 en utilisant un anticorps reconnaissant spécifiquement la partie amino-terminale de la PTHrP. Fig. 3B : Mesure de l'expression du RPTH1
5 par Western blot dans les 3 lignées tumorales 786-0, UOK-126 et UOK-128 avec un anticorps dirigé contre RPTH1.

Figure 4 : La figure 4 représente l'effet des anticorps dirigés contre les diverses régions de la PTHrP sur la prolifération des cellules tumorales 786-0 *in vitro*
10 mesurée sur le nombre de cellules (à gauche) et sur l'incorporation de BrdU (à droite).

Figure 5 : La figure 5 représente l'effet de l'antagoniste des RPTH1, la (Asn10, Leu11, D-Trp12)hPTHrP(7-34) amide (h pour humaine) à diverses concentrations
15 sur la prolifération des cellules tumorales 786-0 *in vitro* mesurée sur le nombre de cellules (à gauche) et sur l'incorporation de BrdU (à droite).

Figure 6 : La figure 6 représente l'effet des anticorps dirigés contre les diverses régions de la PTHrP sur la prolifération des cellules tumorales UOK-126 *in vitro*
20 mesurée sur le nombre de cellules (à gauche) et sur l'incorporation de BrdU (à droite).

Figure 7 : La figure 7 représente l'effet de l'antagoniste des RPTH1, la (Asn10, Leu11, D-Trp12)hPTHrP(7-34) amide à diverses concentrations sur la prolifération
25 des cellules tumorales UOK-126 *in vitro* mesurée sur le nombre de cellules (à gauche) et sur l'incorporation de BrdU (à droite).

Figure 8 : La figure 8 représente l'effet des anticorps dirigés contre les diverses régions de la PTHrP sur la prolifération des cellules tumorales UOK-128 *in vitro*
30 mesurée sur le nombre de cellules (à gauche) et sur l'incorporation de BrdU (à droite).

Figure 9 : La figure 9 représente l'effet de l'antagoniste des RPTH1, la (Asn10, Leu11, D-Trp12)hPTHrP(7-34) amide à diverses concentrations sur la prolifération des cellules tumorales UOK-128 *in vitro* mesurée sur le nombre de cellules (à gauche) et sur l'incorporation de BrdU (à droite).

5

Figure 10 : photographies des cellules 786-0 en culture dans un milieu RPMI 1640 sans sérum (avec 0,1% de BSA) et traitées soit en contrôle (à gauche) soit en présence de 10^{-6} M de l'antagoniste (Asn10, Leu11, D-Trp12)hPTHrP(7-34) amide (à droite) pendant 48h.

10

Figure 11 : La figure 11 représente l'effet de l'antagoniste des RPTH1, la (Asn10, Leu11, D-Trp12)hPTHrP(7-34) amide sur l'apoptose des cellules tumorales 786-0. Fig. 11 A : micrographe de fluorescence des cellules contrôles (en haut) ou des cellules traitées par l'antagoniste de RPTH1 (en bas) avec l'acridine orange (AO : a, c) et le bromure d'éthidium (EB : b, d) (x 400). Fig. 11B : test de fragmentation de l'ADN.

15

Figure 12 : La figure 12 représente la croissance des tumeurs des souris traitées soit en contrôle soit par l'antagoniste selon le protocole pilote décrit dans les exemples qui suivent. Les résultats de croissance sont exprimés en pourcentage par rapport au volume des tumeurs au jour 0 du début des traitements. Cette figure représente également les photographies : en haut une souris traitée en contrôle pendant 25 jours avec ses 4 tumeurs bien visibles et en bas une souris traitée pendant 25 jours par un antagoniste.

20

25

Figure 13 : La figure 13 représente la croissance des tumeurs des souris traitées soit en contrôle soit par l'antagoniste selon le protocole expérimental décrit ci-dessous. Les résultats de croissance sont exprimés en pourcentage par rapport au volume des tumeurs au jour 0 du début des traitements. Cette figure représente également les photographies : en haut une souris traitée en contrôle pendant 17 jours avec sa tumeur bien visible et en bas en exemple deux souris traitées pendant 17 jours par un antagoniste.

30

Figure 14 : La figure 14 représente la croissance des tumeurs des souris traitées soit par un anticorps dirigé contre l'extrémité N-terminale de PTHrP soit par des IgG non-spécifiques selon le protocole expérimental décrit ci-dessous. Les résultats de croissance sont exprimés en pourcentage par rapport au volume des tumeurs au jour 0 du début des traitements. Cette figure représente également les photographies : en haut une souris traitée en contrôle pendant 17 jours avec sa tumeur bien visible et en bas en exemple une souris traitée pendant 17 jours par un anticorps anti-PTHrP (N-term).

Figure 15 : Sur la figure 15 sont représentés à gauche les vecteurs pCR3.1-Uni seul ou codant pour le VHL(1-213). Ces vecteurs ont été transfectés dans les cellules 786-0 (cf. ci-dessous). Trois clones individuels ont été isolés après sélection au G418 ainsi que l'ensemble des clones pour les cellules transfectées par le vecteur seul (786-0 V, clones individuels 2, 3, 4 et clones mélangés p) ou par le vecteur codant pour le VHL (786-0 VHL, clones individuels 2, 3 et clones mélangés p). Parallèlement à ces clones, 3 échantillons de cellules 786-0 non transfectées (786-0 wt pour « wild-type ») et 3 échantillons de cellules HK-2 (cellules tubulaires proximales humaines normales) ont également été testées pour l'expression du VHL et de la PTHrP. Les gels de cette figure représentent l'expression du VHL obtenue par RT-PCR sur l'ARN total isolé des diverses cellules (bande à 340bp) selon le protocole décrit ci-dessous.

Figure 16 : Sur cette figure sont représentés les Western Blots des lysats de cellules 786-0 non transfectées et transfectées avec le vecteur seul ou le vecteur codant pour le VHL, ces lysats étant incubés en présence d'un anticorps dirigé contre l'épitope HA (pVHL) ou la β -actine.

Figure 17 : La Figure 17 de gauche montre par RIA de la PTHrP que la production de PTHrP est diminuée de 50 % dans les cellules 786-0 transfectées avec le vecteur codant pour le VHL (786-0 VHL) par comparaison aux cellules non transfectées (786-0 wt) ou transfectées avec le vecteur seul (786-0 V). La figure 14 de droite représente la sécrétion de PTHrP en pM par 24h et par million de cellules.

Figure 18 : Expression de CAT dans les cellules 786-0 non-transfectées, les clones 3 et 4 de cellules 786-0 transfectées par le vecteur, les clones 2 et 3 de cellules 786-0 transfectées par le vecteur codant pour le VHL, les clones étant transfectés transitoirement avec un plasmide d'expression codant pour la CAT sous la dépendance des promoteurs de hPTHrP (hPTHrP – CAT).

Figure 19 : Diminution du transcript ARNm de hPTHrP dans les cellules 786-0 non-transfectées, les clones 3 et 4 de cellules 786-0 transfectées par le vecteur, les clones 2 et 3 de cellules 786-0 transfectées par le vecteur codant pour le VHL.

10

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

15

EXEMPLES

Sauf mention contraire, les pourcentages donnés sont exprimés en poids. Rdt signifie rendement.

5 Matériels.

L'antagoniste des RPTH1, la (Asn10, Leu11, D-Trp12)PTHrP(7-34) amide (humain, rat) et l'anticorps anti-PTHrP(1-34) (humain, rat) ont été obtenus de chez Bachem (Bachem Biochimie Sarl, Voisins-le-Bretonneux, France). L'anticorps anti-PTHrP(34-53) (Ab-2, humain) a été obtenu de chez Oncogene (France Biochem, 10 Meudon, France) et l'anticorps anti-PTHrP(107-139) (humain) a été donné par le Dr P. Esbrit (Fundacion Jimenez Diaz, Madrid, Espagne).

Lignées cellulaires et mise en culture.

La lignée cellulaire tumorale humaine 786-0 a été obtenue de ATCC (American 15 Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) dont le distributeur en Europe est la société LGC Promochem (Teddington, UK). Les lignées cellulaires tumorales humaines UOK-126 et UOK-128 ont été fournies par le Dr P. Anglard, (IGBMC, Strasbourg, France). La lignée cellulaire 786-0 (ATCC CRL-1932) correspond à des cellules issues d'un CCC humain métastatique (poumons) mutées sur le gène 20 du VHL [perte d'1 allèle et délétion partielle du second produisant un VHL de 104 acides aminés, VHL (1-104), au lieu de VHL(1-213)] et tumorigéniques (Williams et al, In Vitro, 12: 623-627, 1976), la lignée cellulaire UOK-126 correspond à des cellules issues d'un CCC humain, perte d'hétérozygotie sur le chromosome 3p (Anglard et al, Cancer Res., 52: 348-356, 1992) et la lignée cellulaire UOK-128 25 correspond à des cellules issues d'un CCC humain, perte d'hétérozygotie sur le chromosome 3p (Anglard et al, Cancer Res., 52: 348-356, 1992).

Les cellules 786-0 ont été maintenues en culture dans un milieu RPMI 1640 (Invitrogen Sarl, Cergy Pontoise, France) contenant 300mg/l de L-Glutamine et supplémenté en NaHCO₃ (20mM), D-Glucose (25mM), tampon HEPES (10mM), 30 pyruvate de sodium (1mM), de sérum foetal bovin (10% ; Invitrogen Sarl) et d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline 100U/ml et streptomycine 100 µg/ml) à 37°C dans un environnement contenant 10% de CO₂ dans l'air. Les cellules UOK-126 et UOK-128 ont été maintenues en culture dans un milieu DMEM (« Dulbecco

Modified Eagle Medium ») contenant 10% de sérum foetal bovin et le mélange d'antibiotiques à 37°C dans un environnement contenant 10% de CO₂ dans l'air. Pour les expériences de prolifération, les cellules ont été sous-cultivées (passage) par digestion à la trypsine (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) et traitées selon
5 les conditions décrites ci-dessous.

Animaux.

Les souris mâles athymiques nude Swiss Nu/Nu âgées de 7 semaines à leur arrivée et pesant environ 30g ont été obtenues de Iffa-Credo (L'Arbresle,
10 France). Les souris ont été hébergées dans des enceintes protégées et ventilées dans des conditions exemptes de pathogènes sous un cycle diurne 12h - nocturne 12h et avec libre accès à la nourriture et à l'eau de boisson préalablement autoclavées.

15 Isolement des ARN et analyse de l'expression par RT-PCR.

L'ARN total est extrait des cellules tumorales en culture par la technique au Trizol (Invitrogen Sarl) selon le protocole défini par le fournisseur. L'obtention des ADNc totaux est réalisé par transcription reverse (RT) sur 2,5 à 10 µg d'ARN total dans un mélange contenant 200U de transcriptase reverse (Fermentas –
20 Euromedex, Souffelweyerheim, France), 10U d'inhibiteur de RNase (Invitrogen Sarl), 1mM de désoxynucléotides triphosphates (dNTP, Invitrogen Sarl) et 1 µM d'amorce non spécifique p(dT)₁₅ (Roche Diagnostics, Meylan, France) pendant 1 h à 37°C. L'amplification par PCR est réalisée avec 0,15 µM d'amorces spécifiques :

. soit de la PTHrP humaine

25 SEQ ID N°1 (sens): ATG CGA CGG AGA CTG GTT CAG;

SEQ ID N°2 (antisens): TCA ATG CCT CCG TGA ATC GAG CTC CAG
CGA CGT (fragment obtenu de 535 bp)

. soit du RPTH1 humain

SEQ ID N°3 (sens): AGG AAC AGA TCT TCC TGC TGC A;

30 SEQ ID N°4 (antisens): CAC AGC TAC GGT GAG GGA CGC CAG,
(fragment obtenu de 515 bp)

. soit du VHL humain (Fukuzumi et al, Cancer Letters, 161 : 133-140, 2000)

SEQ ID N°5 (sens): GCG TCG TGC TGC CCG TAT G ;

SEQ ID N°6 (antisens) : TTC TGC ACA TTT GGG TGG TCT TC,
(fragment obtenu de 340bp),

. soit du GAPDH humain

SEQ ID N° 7 (sens) : GGA AGG TGA AGG TCG GAG TC.

5 SEQ OD N° 8 (antisens) : GCA GTG ATG GCA TGG ACT G.

0,4 mM de dNTP, 2,5 U de RedTaq DNA polymérase (Sigma) et 0,5 µg (PTHrP) ou 1 µg (RPTH1) d'ADNc. La PCR commence avec une dénaturation à 95°C pendant 4 min, puis les cycles sont programmés de la manière suivante : 1 min à 94°C (dénaturation), 1 min à 60°C (hybridation) et 1 min à 72°C (synthèse).
10 La PCR est lancée pour 30 cycles pour la PTHrP et le RPTH1. Le dernier cycle est suivi d'une extension supplémentaire de 8 min à 72°C. Les produits de la PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% en présence de 0.5 µg/ml de bromure d'éthidium. L'intensité des bandes obtenues après l'électrophorèse est quantifiée grâce à un logiciel d'analyse de gel (SigmaScanPro 4.01, Jandel
15 Scientific, Erkrath, Germany).

Dosage radioimmunologique (RIA) de la PTHrP

Les cellules tumorales ont été cultivées jusqu'à confluence dans les conditions normales de culture (milieu contenant 10% de sérum comme décrit ci-
20 dessus). Les milieux de culture conditionnés des cellules ont alors été prélevés et congelés immédiatement à -80°C. Dans certaines expériences, les cellules ont été cultivées jusqu'à 80% de confluence, puis le milieu de culture a été changé pour du milieu frais. Les cellules ont alors été laissées encore 24h puis le milieu récupéré (dosage de la sécrétion de PTHrP en 24h). La PTHrP est alors dosée
25 par une méthode radioimmunologique, utilisant un anticorps reconnaissant spécifiquement la partie amino-terminale de la PTHrP (kit RIA, Bachem).

Western Blot

L'expression des protéines a été analysée comme décrit dans Massfelder
30 et al (2002, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 639-648) sur 10-30 µg de protéines, en utilisant un anticorps monoclonal de souris anti-HA (Roche Diagnostics, Myelan, France) pour détecter pVHL ou un anticorps anti-hRPTH1. Un anticorps polyclonal

de souris anti- β actine (Sigma-Aldrich) a été utilisé pour visualiser la charge en protéine du gel.

Immunofluorescence de PTHrP et RPTH1.

5 Les cellules ont été préparées comme décrit dans Massfelder et al (1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13630-13635). Des anticorps polyclonaux de lapin purifiés par affinité dirigés contre soit PTHrP(1-34) (N-term Ab) (Bachem), soit hRPTH1 (Eurogentec, Angers, France) ont été utilisés à 5 μ g/ml. Un anticorps secondaire anti-lapin conjugué au TRITC a été utilisé pour la détection. Comme
10 contrôle, un IgG de lapin non-immunisé (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) a été utilisé à la place de l'anticorps primaire.

Plasmides et transfection stable.

Vecteur d'expression. Il a été utilisé le plasmide pCR3.1-Uni dans lequel
15 l'ADNc complet du VHL humain (codant pour une protéine de 213 acides aminés) a été sous-cloné. Dans les transfections contrôles, nous avons utilisé le vecteur pCR3.1-Uni seul.

Protocole de transfection. Les cellules 786-0 ont étéensemencées dans des
20 flacons de culture de 75cm² dans le milieu RPMI 1640 (cf. ci-dessus) supplémenté de 10% de sérum jusqu'à 50% de confluence. Les cellules adhérentes ont alors été lavées 3 fois avec 10 ml de milieu sans sérum puis maintenues dans 5 ml de ce même milieu. Pour transfecter les cellules, 5 μ g d'ADN plasmidique (pCR3.1-Uni seul ou pCR3.1-Uni VHL) dans 50 μ l d'eau sont incubés avec 50 μ l de lipofectamine (Invitrogen Sarl) à 2 mg/ml pendant 30 min à température ambiante.
25 Cette solution est ajoutée goutte à goutte aux cellules puis les boîtes incubées pendant 4 h à 37°C. Après cette période d'incubation 10 ml de milieu RPMI 1640 supplémenté de 10% de sérum ont été ajoutés aux cellules. Après 24h, le milieu est remplacé par du milieu frais contenant 10% de sérum. Deux jours après, le milieu est remplacé par du milieu supplémenté de 10% de FBS et contenant 500
30 μ g/ml de G418 (néomycine) afin de sélectionner les cellules transfectées. La concentration optimale de G418 a été déterminée pour les cellules 786-0 par une « courbe de mort » sur 3 semaines avec des concentrations de 25 à 1000 μ g/ml

de G418 et changement de milieu tous les 3 jours. Pour chaque transfection (vecteur seul ou pCR3.1-Uni VHL), 3 clones ont été sélectionnés ainsi que l'ensemble des clones (tous les clones rassemblés) et maintenus dans le milieu RPMI 1640 avec sérum et supplémenté de 500 µg/ml de G418.

5

Mesure de la prolifération cellulaire.

Traitements des cellules.

Les cellules ont été mises en culture dans des boîtes à 24 puits (1 ml par puit) et dans des boîtes à 96 puits (100 µl par puit) à raison de 10 000 à 30 000C/ml. Les cellules ont été cultivées dans le milieu avec le sérum décrit ci-dessus. Pour les expériences avec l'antagoniste des RPTH1, après 24 h de culture le milieu a été changé pour un milieu sans sérum contenant 0,1 % de BSA (albumine sérique bovine, Sigma) et les antibiotiques. Cette manipulation permet de cultiver les cellules en absence des facteurs présents dans le sérum et permet d'apprécier l'influence de l'antagoniste sur la prolifération cellulaire. Après 24h, les milieux de culture sont remplacés par un milieu toujours sans sérum mais contenant l'antagoniste (Asn10, Leu11, D-Trp12)PTHrP(7-34) amide à diverses concentrations soit le diluant (contrôle) pendant 48h. Pour les expériences avec les anticorps anti-PTHrP, le milieu de culture avec sérum est maintenu et après 24h de culture les cellules sont cultivées en présence soit des anticorps anti-PTHrP (anti-PTHrP(1-34) à 1,5µg/ml, anti-PTHrP(34-53) à 2µg/ml ou anti-PTHrP(107-139) à 5µg/ml soit d'IgG purifiés (5µg/ml, Sigma) pendant encore 48h.

La prolifération cellulaire a été déterminée par deux moyens, d'une part en comptant les cellules (comptage manuel) à partir des boîtes à 24 puits et d'autre part en mesurant l'incorporation de 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU) à partir des boîtes à 96 puits.

Comptage des cellules

Le milieu de culture est retiré par aspiration et un volume adéquat de trypsine-EDTA (Sigma) est ajouté. Les boîtes à 24 puits sont alors mises à l'étuve à 37°C pendant 5 à 10 min jusqu'à ce que les cellules soient bien décollées du fond des boîtes et en suspension individuelle, ce qui est suivi sous microscope optique. Les cellules sont alors récupérées et comptées manuellement à l'aide

d'une cellule de comptage placée sous un microscope optique. Un puit est utilisé par condition expérimentale.

Mesure de l'incorporation de BrdU

Le principe du test utilisé est le suivant : le BrdU, un analogue des
5 pyrimidines, est incorporé à la place de la thymine dans l'ADN des cellules en
prolifération. La mesure de l'incorporation du BrdU est un indice de la synthèse
d'ADN. Le test est effectué grâce à un kit de réaction colorimétrique disponible
dans le commerce (Roche Diagnostics) et selon le protocole décrit par le
fournisseur. La couleur développée et de ce fait les valeurs d'absorbance lues
10 dans le visible sont directement corrélées au taux de synthèse d'ADN et ainsi au
nombre de cellules en prolifération dans les différentes cultures.

Analyse de la mort cellulaire/apoptose

Les cellules ont été traitées dans des conditions contrôles ou avec soit un
15 anticorps anti-PTHrP N-terminal à 1,5 µg/ml, soit un antagoniste de RPTH1 à 1
µM pendant 48 h. L'acridine orange (AO) et le bromure d'éthidium (EB) ont été
dissous dans un tampon PBS et ajoutés à 2 µg/ml dans le milieu de culture. Les
cellules ont été observées et photographiées sous microscopie à fluorescence,
soit pour le FITC (AO) soit pour le TRITC (EB). La fragmentation de l'ADN
20 internucléosomal a été détectée par un test « DNA laddering ». Les cellules ont
été resuspendues dans 300 µl de tampon de lyse (25 mM EDTA, 1 % SDS, 1
mg/ml de protéinase K, pH 8) et incubées sur la nuit à 50 °C. L'ADN a été extrait
par phénol/chloroforme, précipité à l'éthanol et analysé par électrophorèse sur gel
d'agarose.

25

Mesure de l'activité du promoteur de PTHrP

Les cellules 786-0 non transfectées, et les clones transfectés par le vecteur ou le
vecteur-VHL ont été transfectés transitoirement avec une construction contenant
les régions promotrices (Promoteurs P1, P2, et P3) du gène PTHrP liées à un
30 gène chloramphenicol acétyltransférase (CAT) bactérien dénué de promoteur. La
transfection a été effectuée 24 h après le repiquage des cellules avec 1 µg/cm² de
plasmide promoteur PTHrP-CAT ou un plasmide CAT dénué de promoteur en
présence de Lipofectamine. Les cellules ont été analysées 48 h après la

transfection pour l'expression de CAT en utilisant le kit ELISA pour l'enzyme CAT (Roche Diagnostic). Les résultats ont été normalisés et exprimés en pg d'enzyme CAT/ mg de protéine.

5 Tests Actinomycin D

Les cellules 786-0 non transfectées, et les clones transfectés par le vecteur ou le vecteur-VHL ont été exposés à 5 µg/ml d'actinomycine D (Sigma) pendant 0-30 h. Les ARN totaux ont été isolés et l'expression de hPTHrP a été analysée par RT-PCR en utilisant hGAPDH pour normaliser les réactions de PCR.

10 Protocoles expérimentaux chez la souris nude.

Implantation sous-cutanée des cellules 786-0. Les cellules 786-0 ont la particularité d'être tumorigéniques *in vivo* chez la souris nude et sont donc couramment utilisées pour étudier l'effet des drogues sur la croissance tumorale humaine sur ce modèle.

- 15 Les cellules 786-0 ont été cultivées dans le milieu RPMI 1640 supplémenté de sérum jusqu'à confluence. Les cellules ont été récupérées par trypsination et resuspendu dans du milieu RPMI 1640 sans sérum et sans antibiotiques à raison de 5 millions de cellules/200µl le jour même de l'implantation des souris. Les cellules ont été implantées en sous-cutané au niveau du dos chez les souris nude
- 20 à raison de 200µl par implantation. Une semaine à 10 jours après l'implantation des cellules les tumeurs se sont développées formant des nodules d'environ 60 à 300 mm³. A partir de ce moment les traitements ont été initiés selon trois protocoles : un protocole pilote qui a été réalisé afin de déterminer l'efficacité des traitements *in vivo* et réalisé sur deux souris par condition expérimentale recevant
- 25 4 implantations (soit 8 tumeurs/condition expérimentale), et deux protocoles expérimentaux élaborés suite aux résultats obtenus avec le protocole pilote sur 10 ou 5 souris par condition expérimentale et recevant 1 ou 2 implantations (soit 10 tumeurs/condition expérimentale).

- Protocole pilote.** Dans ce protocole, 6 souris ont été séparées en trois
- 30 groupes : un premier groupe recevant des injections d'eau stérile (contrôle), un deuxième recevant des injections d'anticorps anti-PTHrP (1-34) (Bachem, dissout dans l'eau stérile) et un troisième recevant des injections d'antagoniste (Asn10, Leu11, D-Trp12)PTHrP(7-34) amide (Bachem, dissout dans l'eau stérile).

L'ensemble des injections a été réalisé 2 fois par semaine en intra-péritonéal (50µg/souris d'anticorps ou 20µg/souris d'antagoniste dans 200µl) et en intra-tumoral (25µg/souris d'anticorps ou 10µg/souris d'antagoniste dans 100µl). Les souris contrôle recevant une injection d'eau de 200µl en intra-péritonéal et de 100µl d'eau en intra-tumoral. Le volume des tumeurs (longueur x largeur x profondeur x 0,5236) a été mesuré de manière aveugle à l'aide d'un pied à coulisse manuellement aux jours 0, 4, 7, 12, 14, 18, 23 et 25 après la première injection des substances sous anesthésie gazeuse légère à l'isoflurane. Pour la série « anticorps », les injections ont été stoppées après 18 jours.

10 **Premier protocole expérimental.** Les résultats de la série pilote ont montré que les anticorps anti-PTHrP et l'antagoniste des RPTH1 ont une efficacité égale à inhiber la croissance tumorale des tumeurs implantées chez la souris nude. Par conséquent, dans ce protocole d'une part l'effectif de chaque groupe a été augmenté (10 souris avec une tumeur / groupe expérimental) et d'autre part des injections quotidiennes soit d'eau (contrôle) soit de l'antagoniste des RPTH1 (dissout dans l'eau stérile) ont été réalisées. Comme pour le protocole pilote, l'ensemble des injections a été réalisé en intra-péritonéal (200µl d'eau ou 20µg/souris d'antagoniste dans 200µl) et en intra-tumoral (100µl d'eau ou 10µg/souris d'antagoniste dans 100µl). Pour cette série, la taille des tumeurs a été mesurée de manière aveugle deux fois par semaine sous anesthésie gazeuse légère à l'isoflurane. A l'issue de la période expérimentale les souris ont été anesthésiées au pentobarbital. Environ 0,5 ml de sang a alors été récupéré rapidement par ponction intracardiaque de chaque souris pour le dosage des électrolytes et de la PTHrP circulante. Les tumeurs ont été disséquées et fixées dans le formol pour les études histo-pathologiques (aspect nécrotique) et immunohistochimiques ultérieures (facteur VIII, PTHrP, RPTH1, index mitotique et index apoptotique).

Deuxième protocole expérimental. Parallèlement, un protocole expérimental a également été réalisé pour les anticorps anti- PTHrP (N-term) avec des injections quotidiennes intra-péritonéal avec 40 µg/souris soit d'anticorps anti-PTHrP (N-term) soit d'IgG non-spécifique (5 souris avec 2 tumeurs / groupe expérimental).

Index prolifératif et apoptotic. L'index de prolifération a été déterminé par coloration de coupe de tumeur avec un anticorps de souris monoclonal anti-Ki67

humain Dako, Trappes, France) en utilisant des méthodes standard. Le kit de détection de cellules apoptotiques, basé sur la méthode de TUNEL (Roche Diagnostics) a été utilisé pour mesurer l'index apoptotique sur les coupes. Les cellules totales et colorées dans 15 champs (0,25 mm² chacun) de coloration
5 cellulaire la plus élevée ont été comptées pour déterminer les deux index, qui sont exprimés en pourcentage de cellules colorées par rapport aux cellules totales.

Facteur VIII et densité microvasculaire. Les coupes de tumeur ont été colorées pour les cellules endothéliales avec un anticorps polyclonal de lapin anti-facteur VIII humain (Dako) en utilisant les méthodes standards. La densité des
10 microvaisseaux a été déterminée par comptage des points d'intersection entre vaisseaux et du nombre total de vaisseaux de 4 à 5 champs (0,25 mm² chacun) montrant la plus haute densité vasculaire.

Statistiques

- 15 Pour les expériences *in vitro*, les résultats des comptages manuels sont exprimés en pourcentage par rapport au nombre de cellules présentes dans les puits contrôles. Pour calculer les incorporations de BrdU en réponse aux traitements, l'ensemble des valeurs de DO obtenues sont diminuées de la moyenne des DO obtenues pour les puits contrôles négatifs. Les incorporations
20 en réponse aux traitements sont alors exprimées en pourcentage par rapport aux incorporations des contrôles positifs prises comme 100 % d'incorporation. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- ESM et ont été comparés par test-t ou test-t apparié. Une valeur de P au moins < 0.05 est considérée comme reflétant une différence significative.
- 25 Pour les expériences *in vivo* chez la souris nude, les résultats de croissances tumorales ont été exprimés en pourcentage de la taille au jour 0 des traitements. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- ESM. La croissance des tumeurs selon les traitements a été comparée par test-t pour évaluer les différences entre les traitements et par test-t apparié pour apprécier l'évolution de la croissance
30 tumorale dans chaque condition expérimentale. Une valeur de P au moins <0.05 est considérée comme reflétant une différence significative.

Résultats

- Les gels montrant l'expression de la PTHrP et du RPTH1 au niveau de l'ARNm dans 3 échantillons (numéroté 1, 2 et 3) des 3 lignées tumorales 786-0, UOK-126 et UOK-128 sont donnés à la figure 2. Expériences réalisées en RT-PCR.

On constate aisément que les trois lignées expriment la PTHrP et le RPTH1.

- Les résultats représentés sur la figure 3 montrent que les 3 lignées tumorales expriment la PTHrP à l'échelle de la protéine.

10 A titre de comparaison, la sécrétion de PTHrP immunoréactive est indétectable dans les cellules musculaires lisses vasculaires par exemple alors que l'expression de la PTHrP est observable par RT-PCR (résultats non montrés).

Avec les résultats obtenus en RT-PCR, on en conclut que les 3 lignées expriment la PTHrP au niveau du messenger et au niveau de la protéine, ce qui permet
15 d'envisager des effets autocrines/paracrines de la PTHrP sur la prolifération des cellules.

Dans des cellules en culture, PTHrP et RPTH1 ont été localisés par immunofluorescence dans le cytosol et dans les nucléoles. L'allure du marquage était identique pour les trois types cellulaires.

20 - La figure 4 représente l'effet des anticorps dirigés contre les diverses régions de la PTHrP sur la prolifération des cellules tumorales 786-0 *in vitro* mesurée sur le nombre de cellules (à gauche) et sur l'incorporation de BrdU (à droite). La figure 4 montre que les divers anticorps inhibent de 20 à 60 % la prolifération cellulaire, suggérant un effet auto/paracrine de la PTHrP sécrétée sur la prolifération des
25 cellules.

Le fait que les trois anticorps inhibent la prolifération de ces cellules suggèrent que ces cellules sécrètent entre autres des gros fragments amino-terminaux reconnus par les trois anticorps.

N-term: anticorps anti-PTHrP(1-34) (Bachem) 1,5 µg/ml

30 Région int.: anticorps anti-PTHrP (34-53) (Ab-2, Oncogene) 2 µg/ml

C-term: anticorps anti-PTHrP(107-139) (P. Esbrit, Madrid, Espagne) 5 µg/ml

IgG: (Sigma) 5 µg/ml

Nombre d'expériences indépendantes: n=8-12 (figure 4 de gauche); n=4 (figure 4 de droite).

- La figure 5 représente l'effet de l'antagoniste des RPTH1, la (Asn¹⁰, Leu¹¹, D-Trp¹²)hPTHrP(7-34) amide à diverses concentrations sur la prolifération des cellules tumorales 786-0 *in vitro* mesurée sur le nombre de cellules (à gauche) et sur l'incorporation de BrdU (à droite). Ces résultats montrent clairement la capacité de l'antagoniste à inhiber très fortement à 70% la prolifération cellulaire.

Nombre d'expériences indépendantes: n=12 (figure 5 de gauche); n=7-15 (figure 5 de droite).

- La figure 6 représente l'effet des anticorps dirigés contre les diverses régions de la PTHrP sur la prolifération des cellules tumorales UOK-126 *in vitro* mesurée sur le nombre de cellules (à gauche) et sur l'incorporation de BrdU (à droite). La figure montre que les divers anticorps inhibent de 20 à 30 % la prolifération cellulaire, suggérant un effet auto/paracrine de la PTHrP sécrétée sur la prolifération des cellules. Seul l'anticorps dirigé contre la partie C-term ne montre pas d'efficacité.

Cela peut être lié soit à une dilution trop forte de l'anticorps soit au fait que ces cellules sécrètent des fragments amino-terminaux de la PTHrP mais ne présentant pas une immunoréactivité C-terminale. Nombre d'expériences indépendantes: n=4-12 (figure 6 de gauche); n=4-12 (figure 6 de droite).

- La figure 7 représente l'effet de l'antagoniste des RPTH1, la (Asn¹⁰, Leu¹¹, D-Trp¹²)hPTHrP(7-34) amide à diverses concentrations sur la prolifération des cellules tumorales UOK-126 *in vitro* mesurée sur le nombre de cellules (à gauche) et sur l'incorporation de BrdU (à droite). Ces résultats montrent clairement la capacité de l'antagoniste à inhiber très fortement là aussi la prolifération cellulaire.

Nombre d'expériences indépendantes: n=8 (figure 7 de gauche); n=8 (figure 8 de droite).

- La figure 8 représente l'effet des anticorps dirigés contre les diverses régions de la PTHrP sur la prolifération des cellules tumorales UOK-128 *in vitro* mesurée sur le nombre de cellules (à gauche) et sur l'incorporation de BrdU (à droite). La figure montre que les divers anticorps inhibent de 20 à 40 % la prolifération cellulaire, suggérant un effet auto/paracrine de la PTHrP sécrétée sur la prolifération des cellules. Comme pour les cellules UOK-126, seul l'anticorps dirigé contre la partie

C-term montre une efficacité limitée. Avec les résultats obtenus sur la lignée UOK-126, ces résultats suggèrent que cette faiblesse d'efficacité soit due à une dilution trop forte de l'anticorps. Cependant, cet anticorps n'a pas été en quantité suffisante pour augmenter la concentration de l'anticorps dans le milieu. Nombre d'expériences indépendantes: n=4-12 (figure 8 de gauche); n=4-12 (figure 8 de droite).

- La figure 9 représente l'effet de l'antagoniste des RPTH1, la (Asn10, Leu11, D-Trp12)hPTHrP(7-34) amide à diverses concentrations sur la prolifération des cellules tumorales UOK-128 *in vitro* mesurée sur le nombre de cellules (à gauche) et sur l'incorporation de BrdU (à droite). Ces résultats montrent clairement la capacité de l'antagoniste à inhiber très fortement la aussi la prolifération cellulaire. Nombre d'expériences indépendantes: n=8 (figure de gauche); n=8 (figure de droite)

15 Dans les figures 4 à 9 :

* signifie $p < 0,05$ par rapport au contrôle

** signifie $p < 0,01$ par rapport au contrôle

- La figure 10 montre des photographies des cellules 786-0 en culture dans un milieu RPMI 1640 sans sérum (avec 0,1% de BSA) et traitées soit en contrôle (à gauche) soit en présence de 10^{-6} M de l'antagoniste (Asn10, Leu11, D-Trp12)hPTHrP(7-34) amide (à droite) pendant 48h.

On observe clairement que l'antagoniste a comme effet de détacher les cellules du support de culture leur faisant perdre complètement leur adhérence.

Cet effet peut être dû à un effet toxique et/ou un effet apoptotique et/ou un effet nécrotique et/ou un effet anoikitique (apoptose cellulaire par détachement des cellules).

- La figure 11 représente l'effet de l'antagoniste des RPTH1, la (Asn10, Leu11, D-Trp12)hPTHrP(7-34) amide et d'un anticorps dirigé contre l'extrémité N-terminale de PTHrP (N-term Ab) sur l'apoptose des cellules tumorales 786-0. Pour déterminer si l'inactivation de PTHrP/RPTH1 induit la mort cellulaire, les inventeurs ont examiné simultanément des coloration AO et EB pour un contrôle et pour les cellules CCR traitées. EB imprègne les cellules vivantes, agissant uniquement en marqueur de la mort cellulaire, alors que AO imprègne librement et

visualise toutes les cellules du champ. L'exposition à un antagoniste de RPTH1 augmente nettement le nombre de cellule marquée par EB comparé aux cellules non-traitées (Fig. 11A). L'analyse de l'ADN génomique dans les cellules 786-0 traitées a révélé une fragmentation de l'ADN internucléosomal (échelle à 180 pb) 5 spécifique de la mort cellulaire induite par apoptose (Fig. 11B). Le détachement cellulaire, la coloration ainsi que la fragmentation de l'ADN internucléosomal ont été observés pour toutes les lignées cellulaires et quelque soit le moyen utilisé pour bloquer le système PTHrP/RPTH1. Ces résultats suggèrent fortement que PTHrP agit comme un facteur essentiel de croissance et de survie pour les 10 cellules CCR.

- La figure 12 représente la croissance des tumeurs des souris traitées soit en contrôle soit par l'anticorps soit par l'antagoniste selon le protocole pilote décrit ci-dessus. Les résultats de croissance sont exprimés en pourcentage par rapport au jour 0 du début des traitements.

15 On constate aisément que les tumeurs contrôle croissent de manière très importante alors que les tumeurs des souris traitées soit par l'anticorps anti-PTHrP(1-34) soit par l'antagoniste ont une croissance considérablement ralentie par rapport à la croissance des tumeurs des souris traitées en contrôles.

Les photographies montrent en haut une souris traitée en contrôle pendant 25 20 jours avec ses 4 tumeurs bien visibles et en bas une souris traitée pendant 25 jours par l'antagoniste. L'efficacité de l'antagoniste à inhiber la croissance tumorale est évidente.

Nombre d'expériences indépendantes: n=8 (4 tumeurs/souris, 2 souris/conditions expérimentales)

25 * signifie $p < 0,05$ pour la croissance des tumeurs des souris traitées par l'anticorps ou l'antagoniste par rapport à la croissance des tumeurs des souris traitées en contrôle au même jour

** signifie $p < 0,01$ pour la croissance des tumeurs des souris traitées par l'anticorps ou l'antagoniste par rapport à la croissance des tumeurs des souris traitées en 30 contrôle au même jour

signifie $p < 0,01$ pour la croissance des tumeurs des souris traitées en contrôle par rapport au jour 0 de traitement (croissance significative à partir du jour 7)

signifie $p < 0,01$ pour la croissance des tumeurs des souris traitées par l'anticorps ou l'antagoniste par rapport au jour 0 (croissance significative à partir du jour 12 seulement)

Des études statistiques, il apparaît que le traitement deux fois par semaine par l'anticorps ou l'antagoniste des souris est suffisant pour ralentir fortement la croissance tumorale par rapport à la croissance contrôle mais pas pour inhiber complètement cette croissance. C'est pour cela que dans la série expérimentale, il a été décidé d'injecter l'antagoniste tous les jours afin d'évaluer si l'antagoniste est capable d'inhiber complètement la croissance tumorale, voire de la faire régresser.

10 Dans la série expérimentale, le nombre n de souris a été augmenté à 10 par conditions expérimentales.

- La figure 13 représente la croissance des tumeurs des souris traitées soit en contrôle soit par l'antagoniste selon le protocole expérimental décrit ci-dessus. Les résultats de croissance sont exprimés en pourcentage par rapport au jour 0 du début des traitements.

On constate à nouveau que les tumeurs contrôle croissent de manière très importante alors que les tumeurs des souris traitées par l'antagoniste ont une croissance cette fois inhibée totalement (donc bloquée) par rapport à la croissance des tumeurs des souris traitées en contrôles. Cette étude révèle que l'antagoniste

20 exerce au moins des effets cyto-statiques sur les tumeurs.

Nombre d'expériences indépendantes : $n=10$ souris (1 tumeur/souris) par conditions expérimentales

* signifie $p < 0,05$ pour la croissance des tumeurs des souris traitées par l'antagoniste par rapport à la croissance des tumeurs des souris traitées en contrôle au même jour

** signifie $p < 0,01$ pour la croissance des tumeurs des souris traitées par l'antagoniste par rapport à la croissance des tumeurs des souris traitées en contrôle au même jour

signifie $p < 0,05$ pour la croissance des tumeurs des souris traitées en contrôle par rapport au jour 0 de traitement (croissance significative dès le jour 3)

signifie $p < 0,01$ pour la croissance des tumeurs des souris traitées en contrôle par rapport au jour 0 de traitement

Des études statistiques, il apparaît cette fois que le traitement tous les jours des souris par l'antagoniste bloque complètement la croissance tumorale. Certaines tumeurs ont même régressé.

- 5 La figure 14 représente la croissance des tumeurs des souris traitées soit par un anticorps dirigé contre l'extrémité N-terminale de PTHrP soit par des IgG non-spécifiques selon le protocole expérimental décrit ci-dessus. Les résultats de croissance sont exprimés en pourcentage par rapport au jour 0 du début des traitements. De manière surprenante et impressionnante, 7 tumeurs ont disparu, 10 alors que les 3 autres ont régressé de 50 à 80 % dans les souris traitées par les anticorps par rapport aux contrôles.

Nombre d'expériences indépendantes : n=10 tumeurs (2 tumeurs/souris) par conditions expérimentales

- ## signifie $p < 0,01$ pour la croissance des tumeurs des souris traitées en contrôle
15 par rapport au jour 0 de traitement

** signifie $p < 0,01$ pour la croissance des tumeurs des souris traitées par l'anticorps par rapport à la croissance des tumeurs des souris traitées en contrôle au même jour

- 20 Puisque 70 % des tumeurs disparaissent avec le traitement par un anticorps anti-PTHrP et que les tumeurs restantes sont trop petites, les analyses histopathologiques ont été réalisées sur les tumeurs des animaux traités par un antagoniste de RPTH1 et leur contrôle. Aucune différence polymorphique n'a été détectée entre les deux groupes. Les tumeurs obtenues des souris contrôles
25 expriment fortement PTHrP et RPTH1 avec une coloration claire observée dans le cytoplasme de toutes les cellules et dans le nucléole de cellules variées. L'index de prolifération n'était pas différents entre les groupes contrôles et traitées. Par contre, le traitement par l'antagoniste de RPTH1 a doublé l'index apoptotique. De plus, le nombre de points d'intersection des vaisseaux et le nombre total de
30 vaisseaux par aire de surface ont été significativement augmentés.

Globalement, le système ciblant PTHrP/RPTH1 est non seulement efficace contre CCR par une augmentation de l'apoptose des cellules tumorales mais également apparaît ne pas avoir d'effets secondaires nuisibles.

- Sur la figure 15 sont représentés à gauche les vecteurs pCR3.1-Uni seul ou codant pour le VHL(1-213). Ces vecteurs ont été transfectés dans les cellules 786-0 (cf. ci-dessus). Trois clones individuels ont été isolés après sélection au G418 ainsi que l'ensemble des clones pour les cellules transfectées par le vecteur seul
5 (786-0 V, clones individuels 2, 3, 4 et clones mélangés p) ou par le vecteur codant pour le VHL (786-0 VHL, clones individuels 2, 3 et 6 et clones mélangés p). Parallèlement à ces clones, 3 échantillons de cellules 786-0 non transfectées (786-0 wt pour « wild-type ») et 3 échantillons de cellules HK-2 (cellules tubulaires proximales humaines normales) ont également été testées pour l'expression du
10 VHL et de la PTHrP.

Les gels représentent l'expression du VHL obtenue par RT-PCR sur l'ARN total isolé des diverses cellules (bande à 340bp) selon le protocole décrit ci-dessus. On constate aisément que les cellules HK-2 normales expriment 2 fois plus de VHL que les cellules 786-0 wt (1 allèle du gène VHL absent). Dans les clones
15 transfectés avec le vecteur seul l'expression du VHL est équivalente à ce qui est retrouvée dans les cellules 786-0 non transfectées. Par contre, dans les clones transfectés par le VHL, l'expression du VHL est bien augmentée ce qui montre que la transfection est très efficace. Si l'on regarde maintenant l'expression de la PTHrP dans les divers clones et types cellulaires, on observe facilement une
20 corrélation inverse entre l'expression du VHL et l'expression de la PTHrP. Ces résultats montrent que la PTHrP au niveau de son messenger est une cible directe ou indirecte du gène suppresseur de tumeurs VHL. Afin de confirmer cela au niveau de la protéine elle-même (PTHrP immunoréactive), les milieux conditionnés des 786-0 wt, V et VHL ont été récupérés. Les résultats sont
25 représentés sur la figure 17. De plus, les Western Blots de la Figure 16 permettent d'estimer les niveaux de protéine pour VHL.

- La Figure 17 de gauche montre par RIA de la PTHrP, dans les milieux conditionnés de cellules à confluence, que la production de PTHrP est diminuée
30 de 50 % dans les cellules 786-0 transfectées avec le plasmide codant pour le VHL (786-0 VHL) par comparaison aux cellules non transfectées (786-0 wt) ou transfectées avec le vecteur seul (786-0 V).

Afin de confirmer ce résultat, les cellules ont été cultivées jusqu'à 80% de confluence puis le milieu changé pour du milieu frais et laisser 24h afin de

mesurer la sécrétion de PTHrP en 24h. Les cellules ont parallèlement été comptées afin d'exprimer la sécrétion de PTHrP par 24h et par million de cellules. Les résultats de ces expériences sont représentés sur la figure 17 de droite représentant la sécrétion de PTHrP en pM par 24h et par million de cellules. Là encore, on constate aisément que la sécrétion de PTHrP est diminuée de 50% dans les cellules 786-0 VHL par rapport aux cellules contrôles non transfectées ou transfectées par le vecteur seul. D'autre part, l'expression de RPTH1 n'est pas affectée par pVHL. Ainsi, PTHrP est réprimé par pVHL. Ces résultats montrent avec ceux présentés sur la figure 15 que la PTHrP est une cible directe ou indirecte (par exemple via le HIF pour « hypoxic-induced factor ») du produit du gène VHL dans les cellules tumorales.

Nombre d'expériences indépendantes: n=12-14 (figure de gauche) et n=5 (figure de droite)

* Signifie $p < 0,01$ pour la sécrétion de PTHrP des cellules 786-0 VHL par rapport aux cellules contrôles 786-0 wt et 786-0 V

Pour analyser si PTHrP est régulé par pVHL au niveau transcriptionnel, les inventeurs ont transfecté de manière transitoire les cellules 786-0 non-transfectées, les clones 3 et 4 de cellules 786-0 transfectées par le vecteur seul, les clones 2 et 3 de cellules 786-0 transfectées par le vecteur codant pour le VHL avec un vecteur d'expression de CAT contenant les régions promotrices du gène PTHrP humain et ils ont mesuré l'enzyme CAT dans les extraits cellulaires. La réintroduction du gène VHL dans les cellules 786-0 n'altère pas l'activité transcriptionnelle des promoteurs PTHrP (Figure 18) suggérant que la régulation est post-transcriptionnelle. L'analyse de la stabilité des ARNm de PTHrP dans les cellules 786-0 non-transfectées, les clones 3 et 4 de cellules 786-0 transfectées par le vecteur seul, les clones 2 et 3 de cellules 786-0 transfectées par le vecteur codant pour le VHL soumis à un inhibiteur transcriptionnel, actinomycine D, montre en effet que la demie-vie des ARNm de PTHrP était de $38,3 \pm 3$ h et $40,1 \pm 3,4$ h pour les cellules 786-0 non-transfectées et les cellules 786-0 transfectées par le vecteur seul, respectivement, et est diminuée de 50 % à $20,9 \pm 2,6$ h pour les cellules 786-0 transfectées par le vecteur codant pour le VHL (Figure 19). Ainsi,

pVHL diminue l'expression de PTHrP dans le CCR en déstabilisant les ARNm de PTHrP.

Ce lien entre la PTHrP et le VHL suggère fortement que la PTHrP puisse être
5 impliquée dans la croissance de la majorité des CCC, et de ce fait que l'utilisation
des anticorps anti-PTHrP ou des antagonistes des RPTH1 constitue un outil
thérapeutique chez l'homme très prometteur pour lutter contre ce fléau.
L'ensemble des résultats présentés ici *in vitro* et *in vivo* vont largement dans ce
sens.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un antagoniste de la PTHrP dans la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à traiter, de manière préventive ou
5 curative, un cancer du rein et en particulier le carcinome à cellules rénales (CCR) chez le mammifère et en particulier chez l'homme.

2. Utilisation selon la revendication précédente, caractérisée en ce que la composition est destinée à traiter le carcinome papillaire (chromophiles), le
10 carcinome à cellules chromophobes, le carcinome de Bellini ou les carcinomes à cellules rénales non classées, ou de préférence le carcinome à cellules claires (CCC).

3. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce
15 que la composition est destinée à inhiber ou diminuer la croissance tumorale et/ou la formation de métastases dans le cancer du rein et/ou ses évolutions métastatiques, en particulier au niveau du poumon et du foie.

4. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce
20 que la composition est destinée au traitement de tumeurs malignes du cancer du rein, plus spécifiquement au traitement de tumeurs malignes solides.

5. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'antagoniste de la PTHrP est une substance se liant au récepteur de la
25 PTHrP inhibant de manière partielle, voire totale, la liaison de la PTHrP à son récepteur.

6. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'antagoniste de la PTHrP est un antagoniste du récepteur de la PTHrP, et de préférence un
30 antagoniste compétitif de la PTHrP.

7. Utilisation selon l'une des revendications 5 et 6, caractérisée en ce que l'antagoniste de la PTHrP est choisi parmi des peptides de la PTH ou de la PTHrP comprenant une substitution ou une délétion d'au moins un acide aminé de la

séquence de la PTH ou de la PTHrP ou une séquence partielle du peptide PTH ou PTHrP, éventuellement comprenant une substitution ou une délétion d'au moins un acide aminé de leur séquence.

5 8. Utilisation selon l'une des revendications 5 à 7, caractérisée en ce que l'antagoniste de la PTHrP est choisi parmi la PTHrP (3-34), PTHrP (7-34), PTHrP (8-34), PTHrP (9-34), PTHrP (10-34), leurs amides et leurs variants.

 9. Utilisation selon l'une des revendications 5 à 7, caractérisée en ce que
10 l'antagoniste de la PTHrP est un antagoniste non peptidique.

 10. Utilisation selon l'une des revendications 5 à 7, caractérisée en ce que l'antagoniste de la PTHrP est un dérivé du TIP.

15 11. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'antagoniste de la PTHrP est une substance se liant à un ligand du récepteur de la PTHrP en inhibant de manière partielle, voire totale, la liaison de PTHrP à son récepteur.

20 12. Utilisation selon la revendication précédente, caractérisée en ce que l'antagoniste de la PTHrP est un anticorps anti-PTHrP, et de préférence un anticorps anti-PTHrP humanisé.

 13. Utilisation selon la revendication précédente, caractérisée en ce que
25 l'anticorps anti-PTHrP est choisi parmi un anticorps humanisé, un anticorps humain, un anticorps chimérique, un anticorps obtenu à partir d'un hybridome ou un fragment de ces anticorps et/ou une forme modifiée dudit fragment.

 14. Utilisation selon l'une des revendications 12 et 13, caractérisée en ce
30 que l'anticorps anti-PTHrP est un anticorps polyclonal ou de préférence monoclonal.

15. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'antagoniste de la PTHrP est une substance se liant à l'ARNm ou au gène de PTHrP en inhibant, de manière partielle, voire totale, l'expression de PTHrP.

- 5 16. Utilisation selon la revendication précédente, caractérisée en ce que l'antagoniste de la PTHrP est un oligonucléotide antisense de la PTHrP, un ARNi, un facteur de transcription réprimant l'expression du gène de la PTHrP, ou une substance diminuant la stabilité de l'ARNm de la PTHrP

1/19

Figure 1

La PTHrP:
une poly-hormone

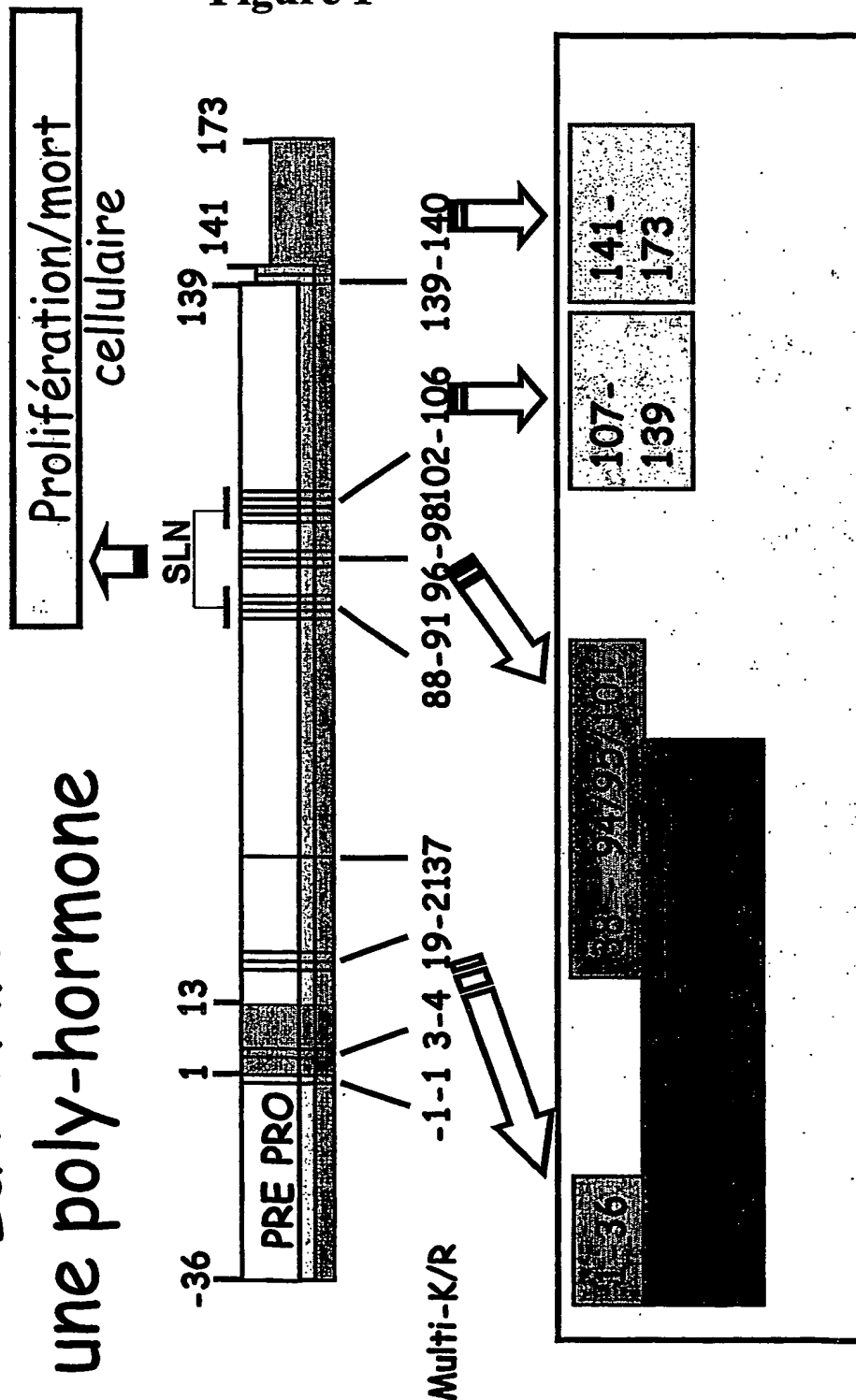
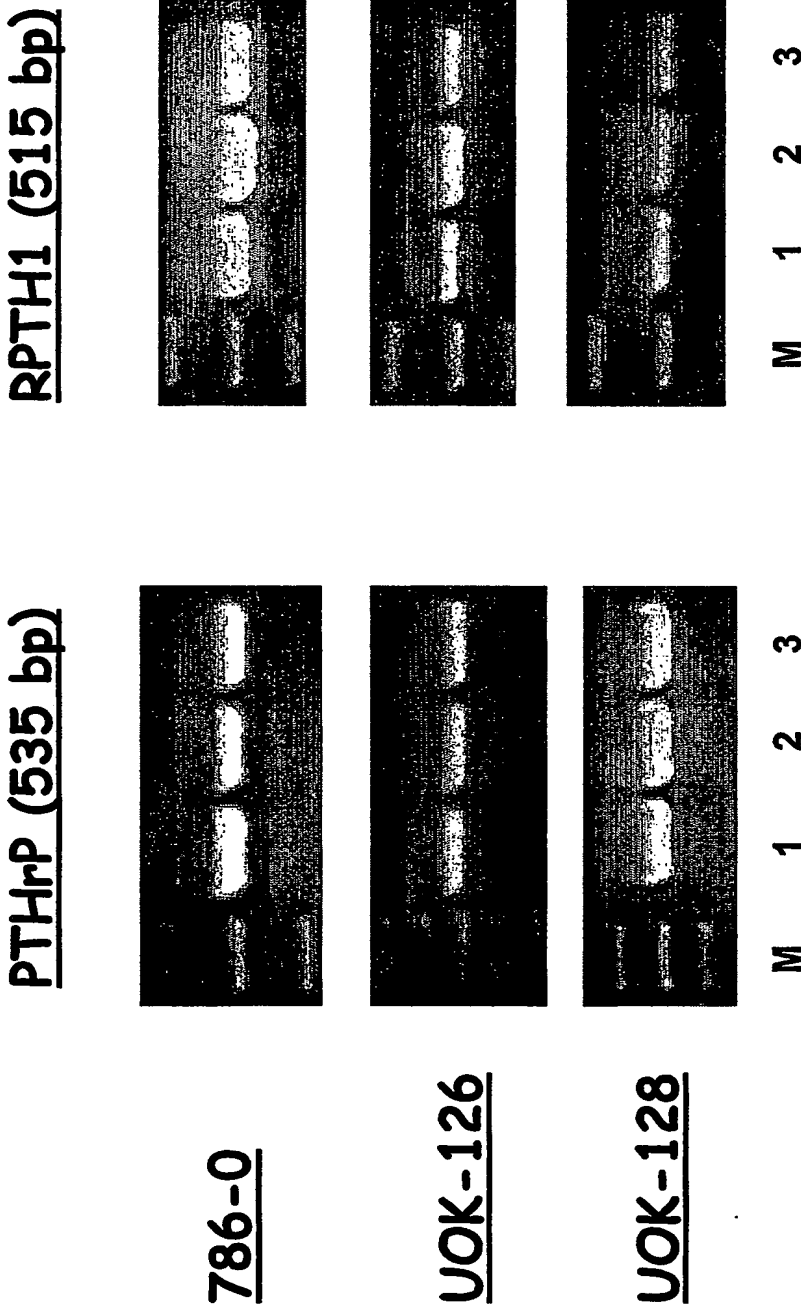


Figure 2

Expression de la PTHrP et du RPTH1:
ARNm (RT-PCR)



3/ 19

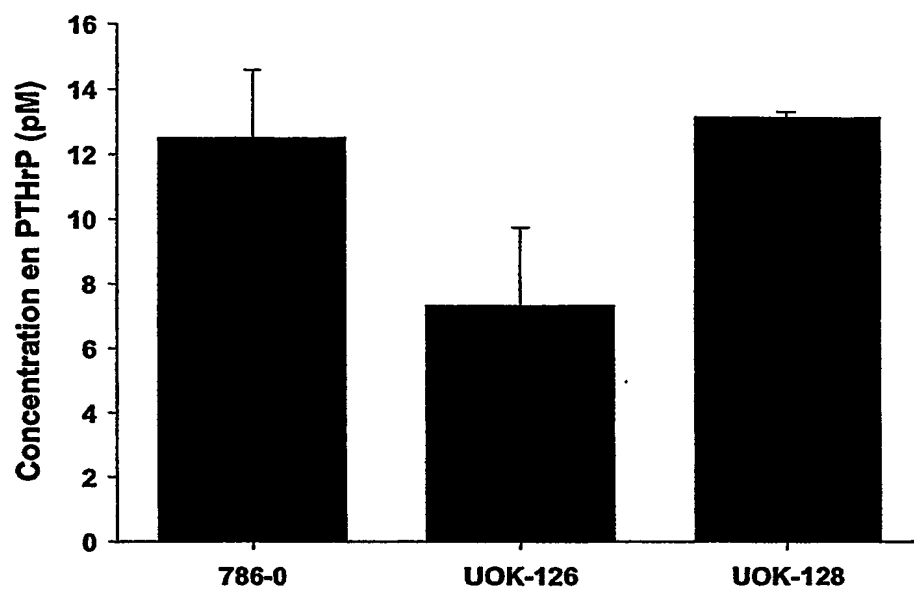


Figure 3A

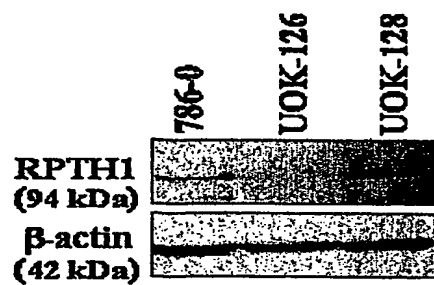
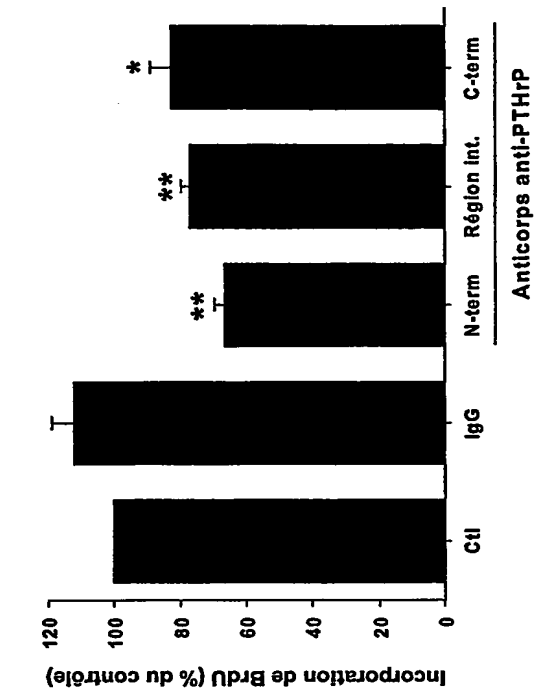


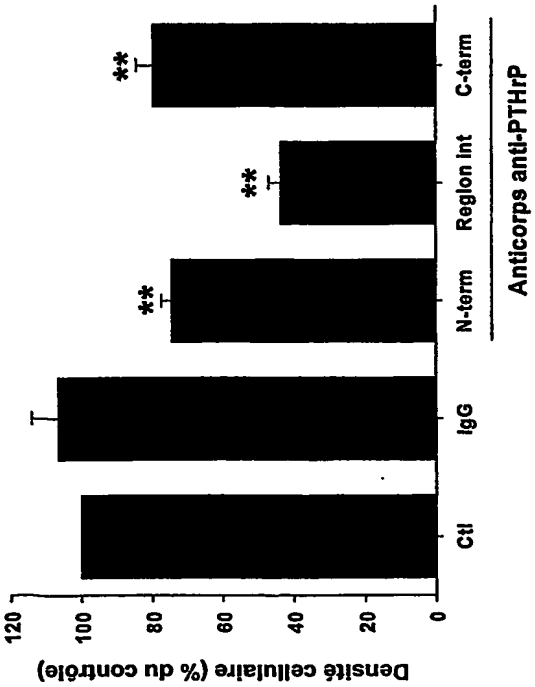
Figure 3B

Figure 4

Incorporation de BrdU



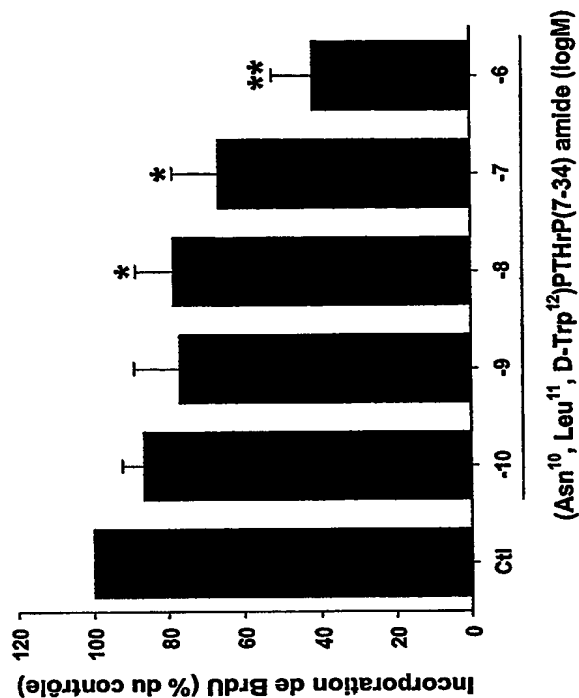
Nombre de cellules



5/19

Figure 5

Incorporation de BrdU



Nombre de cellules

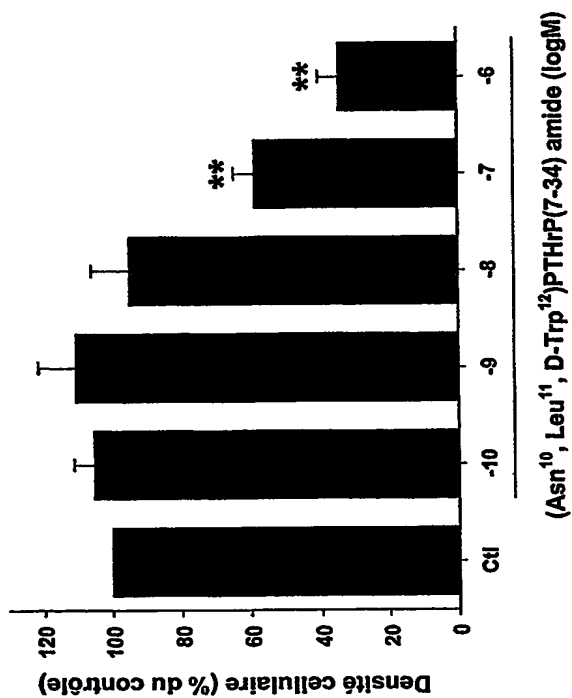
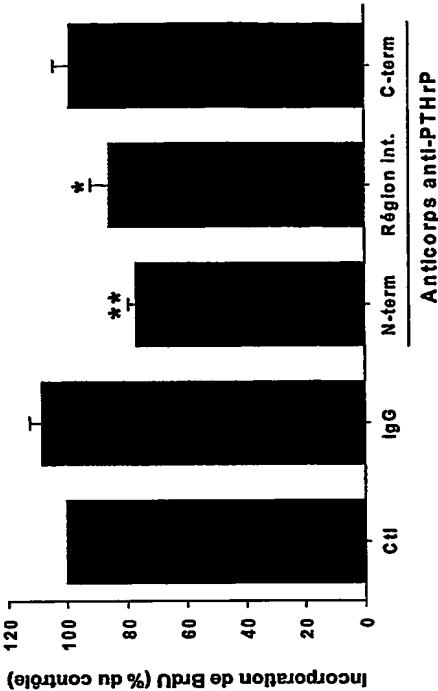


Figure 6

Incorporation de BrdU



Nombre de cellules

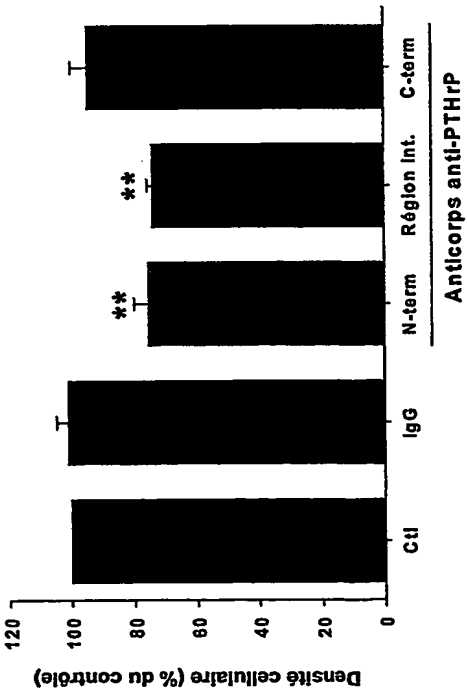
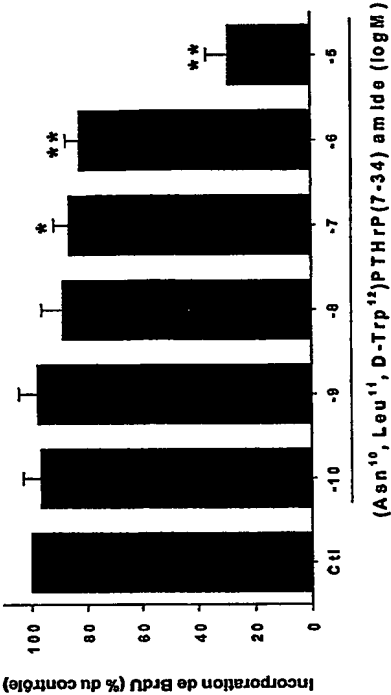


Figure 7

Incorporation de BrdU



Nombre de cellules

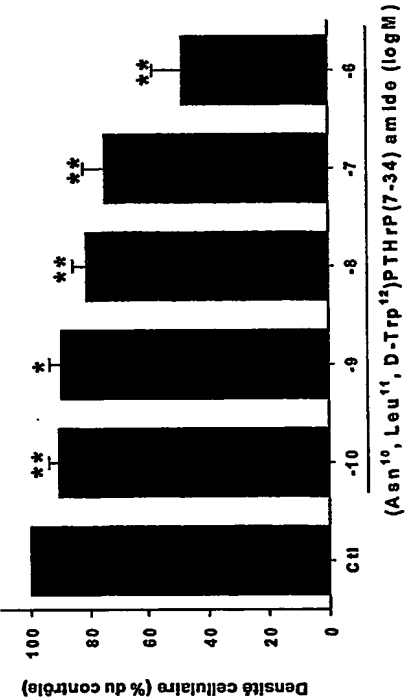
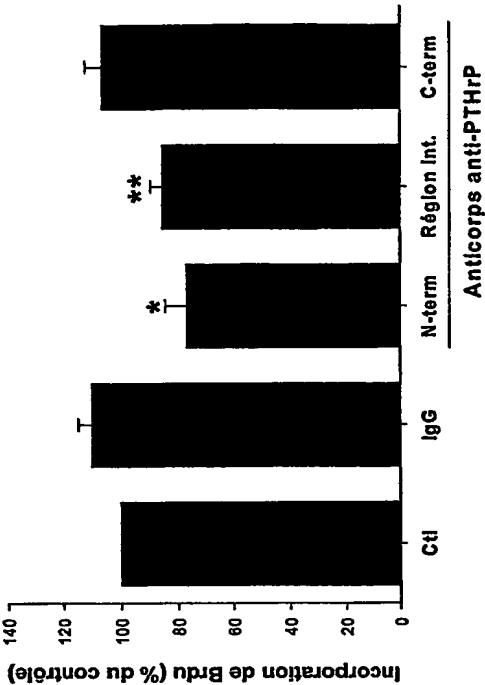
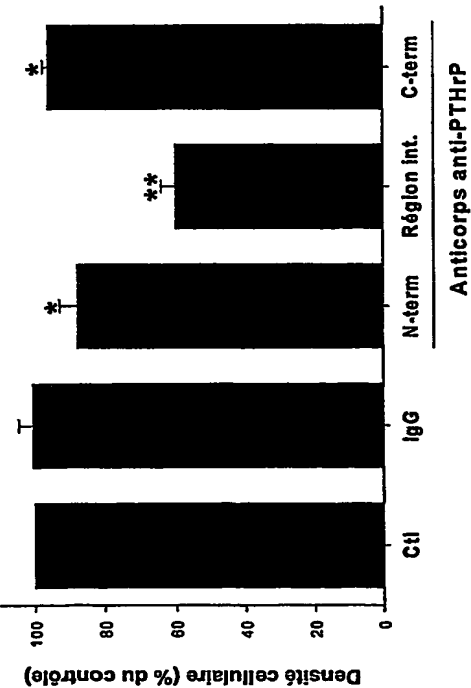


Figure 8

Incorporation de BrdU



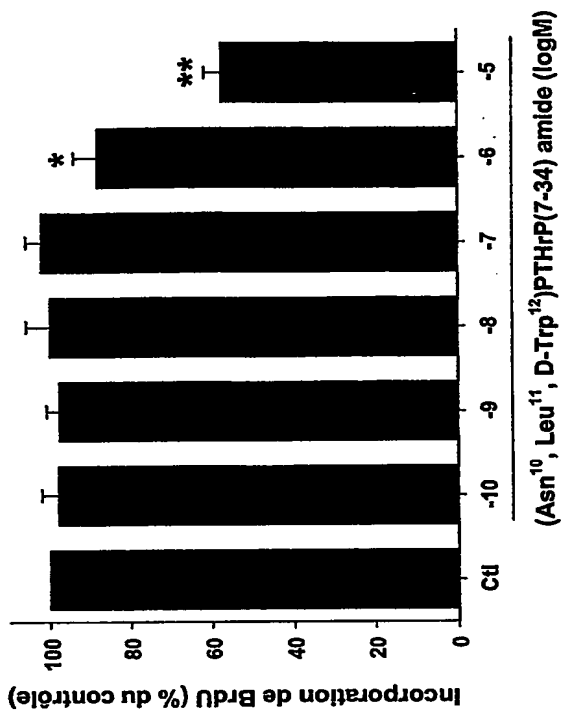
Nombre de cellules



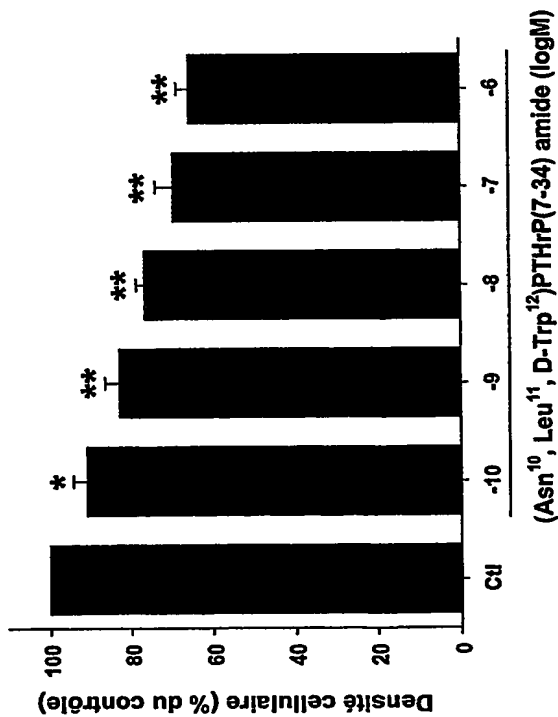
9/19

Figure 9

Incorporation de BrdU



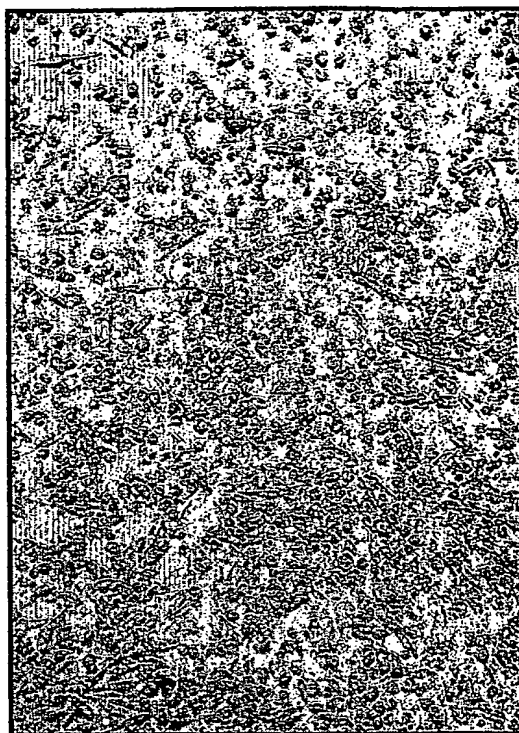
Nombre de cellules



10/ 19

Figure 10

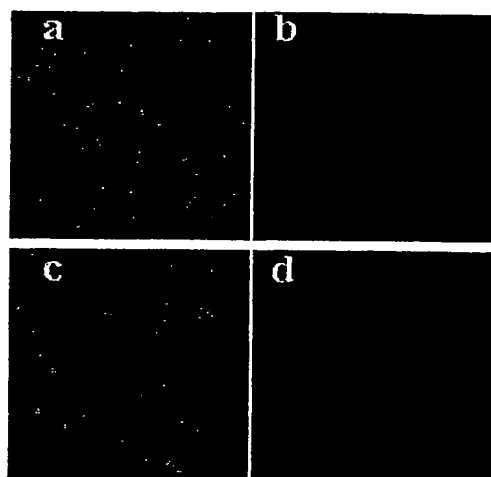
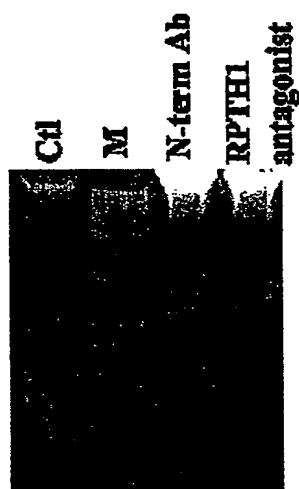
Traitement par l'antagoniste



Traitement contrôle

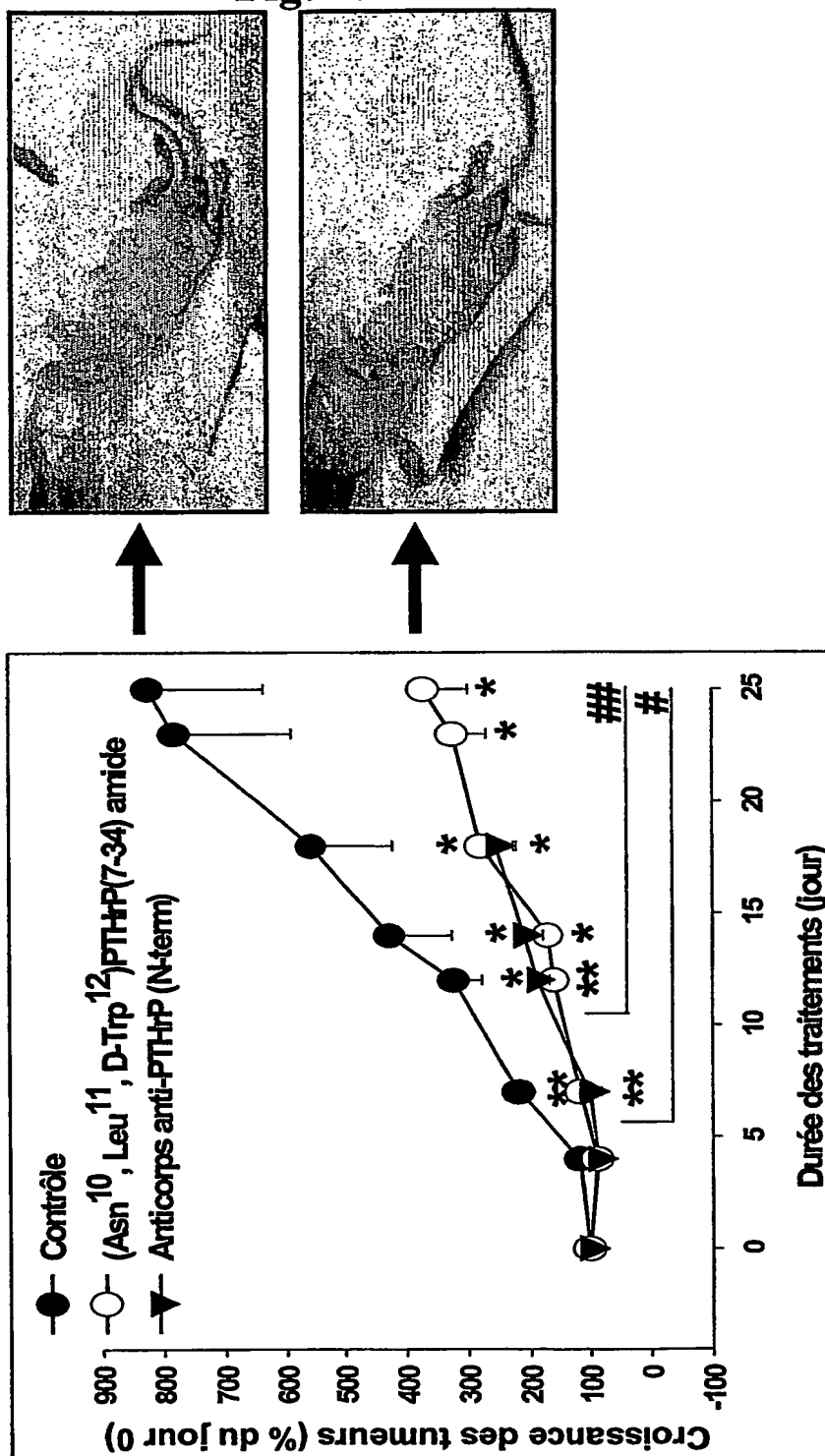


11/ 19

**Figure 11A****Figure 11B**

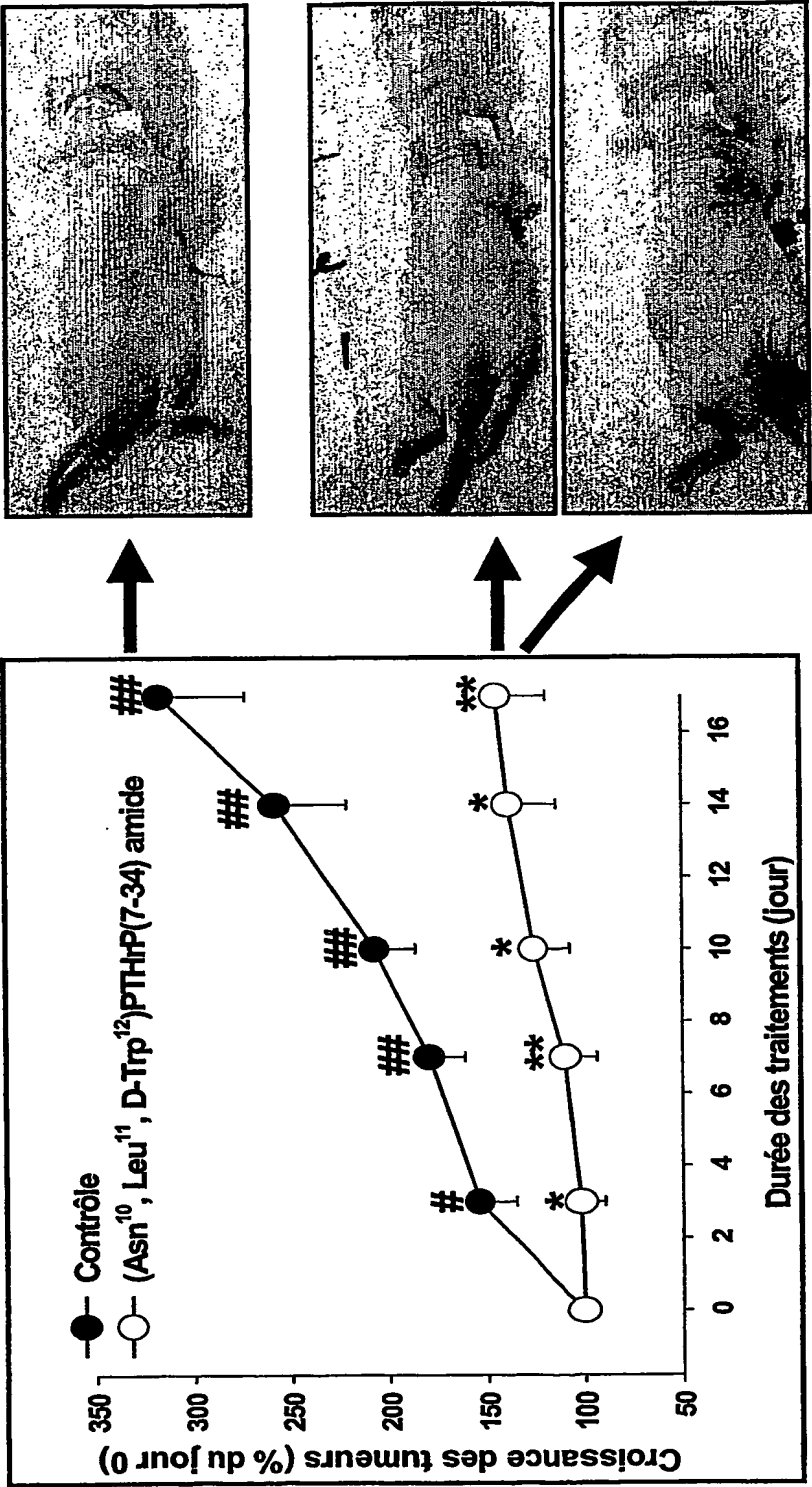
12/ 19

Figure 12



13/ 19

Figure 13



14/ 19

Figure 14

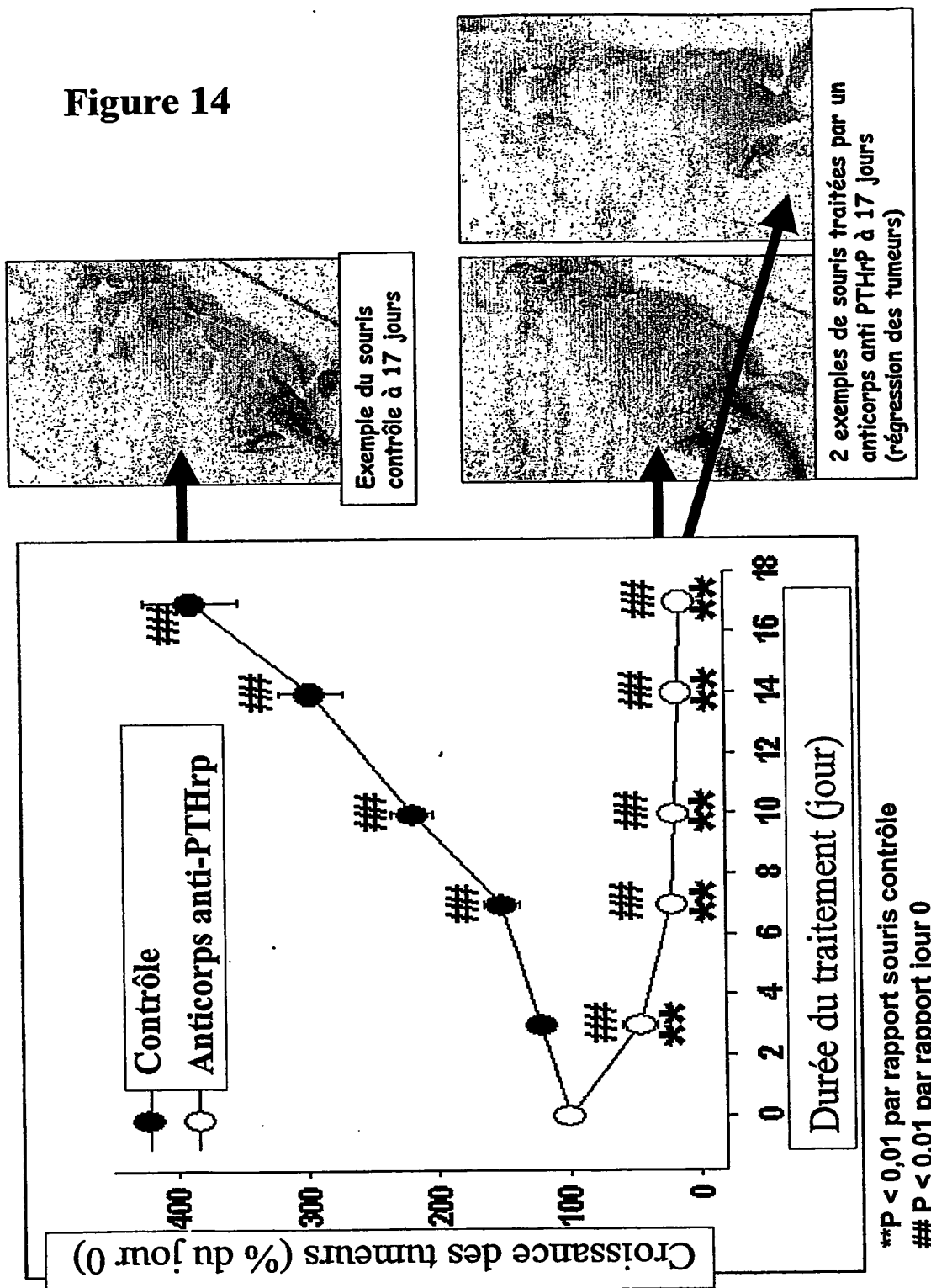
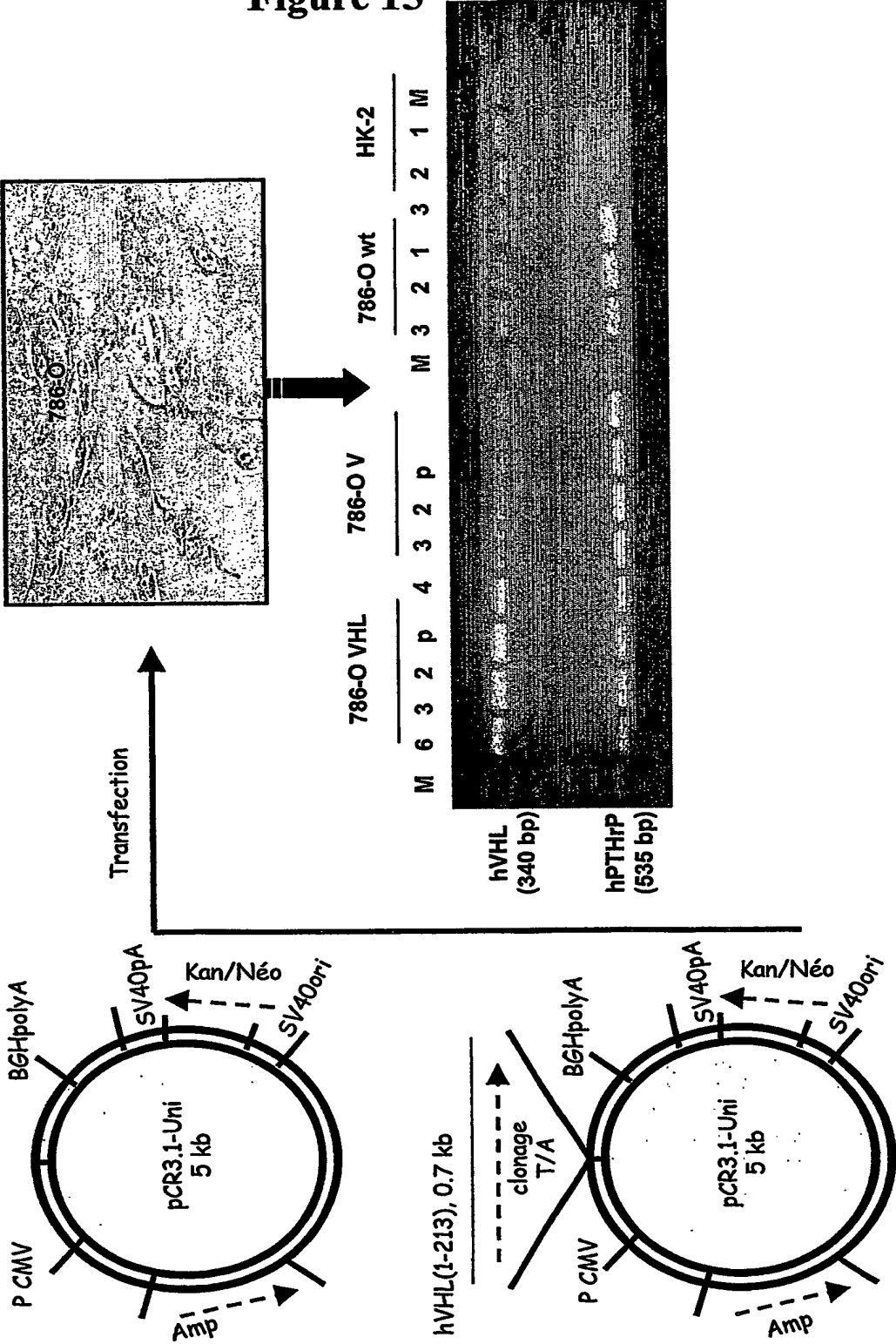


Figure 15



16/ 19

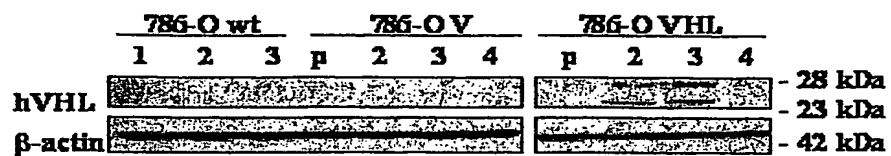
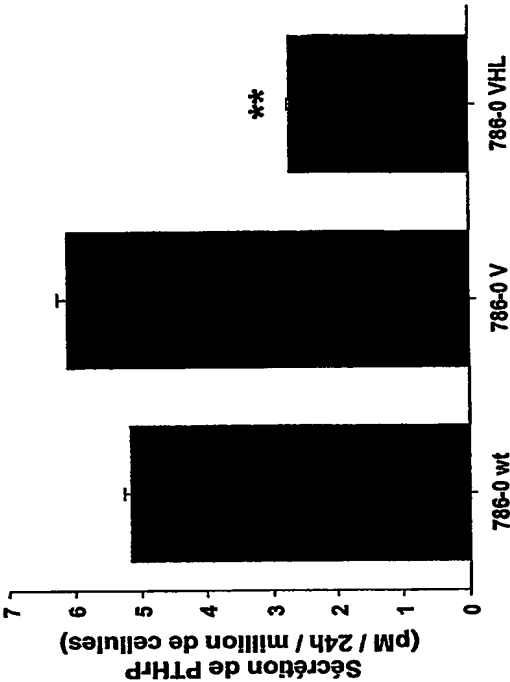
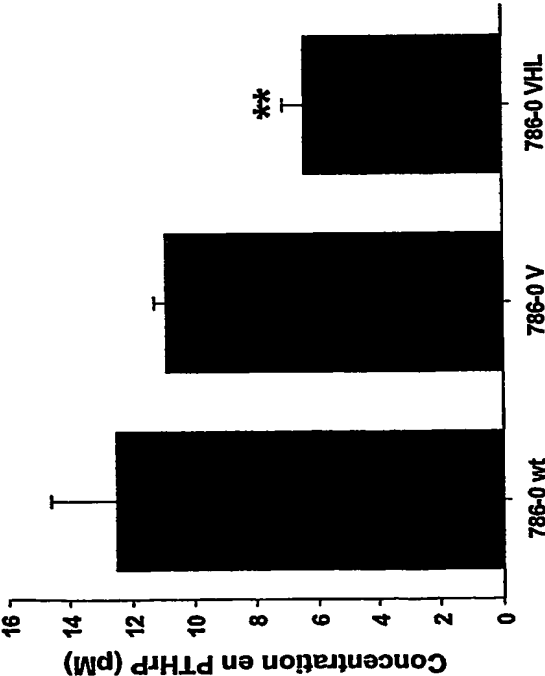
Figure 16

Figure 17

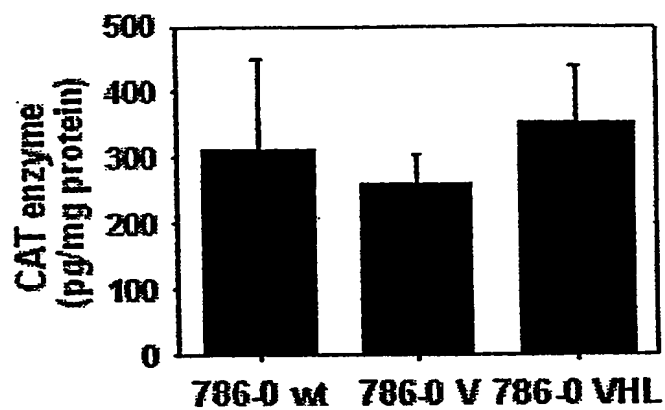
Sécrétion de PTHrP des cellules par
24 h et pour 1 million de cellules



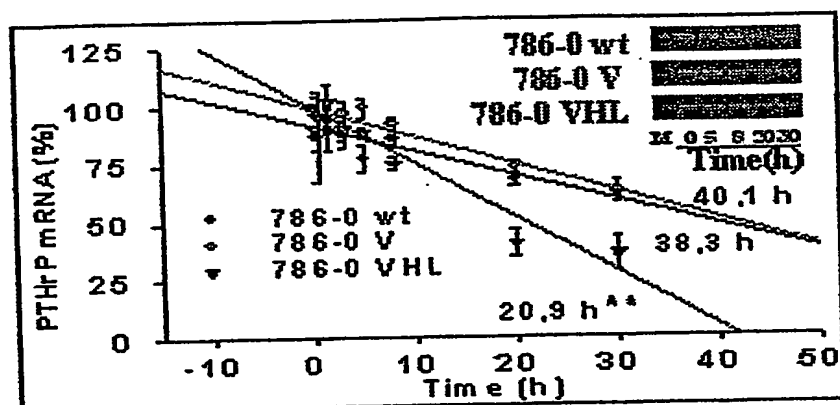
Sécrétion de PTHrP des
cellules à confluence



18/ 19

Figure 18

19/19

Figure 19

1
SEQUENCE LISTING

<110> Université Louis Pasteur - INSERM - Hôpitaux Universitaires de
Strasbourg

<120> utilisation d'antagonistes de la pThrP pour traiter le carcinome à
cellules rénales

<130> B0148WO

<150> FR 02 08501

<151> 2002-07-05

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 1
atgcgacgga gactggttca g

21

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 2
tcaatgcctc cgtgaatcga gctccagcga cgt

33

<210> 3

2

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 3
aggaacagat cttcctgctg ca

22

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 4
cacagctacg gtgagggacg ccag

24

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 5
gcgtcgtgct gcccgtatg

19

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 6
ttctgcacat ttgggtgggc ttc

23

3

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 7

ggaaggtgaa ggtcggagtc

20

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 8

gcagtgatgg catggactg

19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC 03/02084

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K38/29 A61K38/17 A61K39/395 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	P.B. BURTON ET AL.: "Parathyroid hormone related peptide can function as an autocrine growth factor in human renal cell carcinoma." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 167, no. 3, 30 March 1990 (1990-03-30), pages 1134-1138, XP002237379 ORLANDO, FL, US	1,3-7, 11-14
Y	the whole document --- -/-	2,8-10, 15,16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 November 2003

Date of mailing of the international search report

04/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC 03/02084

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>W.M. SAVAGE ET AL.: "PTHrP assay in long term follow up of renal clear cell carcinoma, and demonstration of PTHrP mRNA in tumor tissue." JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, vol. 137, no. suppl., 1993, page P57 XP008015885 * résumé *</p>	2
Y	<p>EP 1 197 225 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD) 17 April 2002 (2002-04-17) cited in the application page 4, line 9 - line 35; claims 1,14-17</p>	8,9
Y	<p>S.R.J. HOARE ET AL.: "Specificity and stability of a new PTH1 receptor antagonist, mouse TIP(7-39)." PEPTIDES, vol. 23, no. 5, May 2002 (2002-05), pages 989-998, XP002237380 cited in the application * page 989, résumé *</p>	10
Y	<p>K. AKINO ET AL.: "PARATHYROID HORMONE-RELATED PEPTIDE IS A POTENT TUMOR ANGIOGENIC FACTOR" ENDOCRINOLOGY, BALTIMORE, MD, US, vol. 141, no. 11, November 2000 (2000-11), pages 4313-4316, XP001051188 ISSN: 0013-7227 cited in the application the whole document</p>	15,16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

FR 03/02084

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1-11, 15 and 16 (all in part)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

**see supplementary sheet FOLLOWING INFORMATION
PCT/ISA/210**

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Claim nos.: 1-11, 15 and 16 (all in part)

The present claims 1-11, 15 and 16 (all in part) relate to the use of a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that of being a PTHrP antagonist.

The claims cover all of the compounds that have this characteristic or property, yet the application provides support (PCT Article 6) and/or disclosure (PCT Article 5) for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims lack support and the application lacks disclosure to such an extent that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought.

Independently of the reasons given above, the claims also lack clarity.

Indeed, an attempt has been made to define the compound in terms of the aim to be achieved. In the present case this lack of clarity is, again, such that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Therefore, the search was directed to the parts of the claims of which the subject matter appears to be clear, supported and sufficiently disclosed, that is the parts relating to the compounds as defined in part in claim 8, and the variant as mentioned on page 8, line 2 of the description, as well as the TIP derivative as mentioned on page 8, lines 6-11 of the description.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT 03/02084

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1197225 A	17-04-2002	AU 5708500 A	22-01-2001
		CA 2373885 A1	11-01-2001
		EP 1197225 A1	17-04-2002
		WO 0102011 A1	11-01-2001

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT 03/02084

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K38/29 A61K38/17 A61K39/395 A61P35/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	P.B. BURTON ET AL.: "Parathyroid hormone related peptide can function as an autocrine growth factor in human renal cell carcinoma." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 167, no. 3, 30 mars 1990 (1990-03-30), pages 1134-1138, XP002237379 ORLANDO, FL, US	1,3-7, 11-14
Y	le document en entier ----- -/-	2,8-10, 15,16

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 novembre 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/12/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ryckebosch, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT 03/02084

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	W.M. SAVAGE ET AL.: "PTHrP assay in long term follow up of renal clear cell carcinoma, and demonstration of PTHrP mRNA in tumor tissue." JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, vol. 137, no. suppl., 1993, page P57 XP008015885 * résumé *	2
Y	EP 1 197 225 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD) 17 avril 2002 (2002-04-17) cité dans la demande page 4, ligne 9 - ligne 35; revendications 1,14-17	8,9
Y	S.R.J. HOARE ET AL.: "Specificity and stability of a new PTH1 receptor antagonist, mouse TIP(7-39)." PEPTIDES, vol. 23, no. 5, mai 2002 (2002-05), pages 989-998, XP002237380 cité dans la demande * page 989, résumé *	10
Y	K. AKINO ET AL.: "PARATHYROID HORMONE-RELATED PEPTIDE IS A POTENT TUMOR ANGIOGENIC FACTOR" ENDOCRINOLOGY, BALTIMORE, MD, US, vol. 141, no. 11, novembre 2000 (2000-11), pages 4313-4316, XP001051188 ISSN: 0013-7227 cité dans la demande le document en entier	15,16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

mandat internationale n°
PCT/FR 03/02084

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n^{os} 1-11, 15 et 16 (toutes partiellement) se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUEES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 1-11, 15 et 16 (toutes partiellement)

Les revendications 1-11, 15 et 16 (toutes partiellement) présentes ont trait à l'utilisation d'un composé défini en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir d'être un antagoniste de la PTHrP.

Les revendications couvrent tous les composés présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit un fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT que pour un nombre très limité de tels composés. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir le composé au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. En conséquence, la recherche n'a été effectuée que pour les parties des revendications dont l'objet apparaît être clair, fondé et suffisamment exposé, à savoir les parties concernant les composés tels que définis en partie dans la revendication 8 et le variant tel que mentionné dans la description à la page 8, ligne 2, ainsi que le dérivé du TIP, tel que mentionné à la page 8, lignes 6 à 11 de la description.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT 03/02084

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 1197225 A	17-04-2002	AU 5708500 A	22-01-2001
		CA 2373885 A1	11-01-2001
		EP 1197225 A1	17-04-2002
		WO 0102011 A1	11-01-2001

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.